

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

IURA GONZALEZ NOGUEIRA ALVES

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL
EXPERIMENTAL EM SISTEMAS BIOLÓGICOS CENTRAIS
DE REGULAÇÃO DA NOCICEPÇÃO EM RATOS**

**ARACAJU
2016**

IURA GONZALEZ NOGUEIRA ALVES

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL
EXPERIMENTAL EM SISTEMAS BIOLÓGICOS
CENTRAIS DE REGULAÇÃO DA NOCICEPÇÃO EM
RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Valter Joviniano de Santana Filho

**ARACAJU
2016**

IURA GONZALEZ NOGUEIRA ALVES

**INFLUÊNCIA DO HIPOTIREOIDISMO
GESTACIONAL EXPERIMENTAL EM SISTEMAS
BIOLÓGICOS CENTRAIS DE REGULAÇÃO DA
NOCICEPÇÃO EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 29/07/2016

Orientador: Prof. Dr. Valter Joviniano de Santana Filho

1º Examinador: Prof. Dr. Luis Felipe da Silva

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Evellyn de Oliveira Machado

3º Examinador: Prof^a. Dr^a. Jullyana de Souza Siqueira Quintans

4º Examinador: Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo

PARECER

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha filha
Melina que, mesmo tão pequena,
soube entender as minhas ausências.
Minha filha, eu continuei firme
neste propósito pois você foi o meu
combustível e o meu ar. Te amo!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha filha Melina. Ela soube exatamente o que era ser filha de uma doutoranda desde que nasceu. Aos oito meses, mesmo tão pequena, foi para o berçário em tempo integral, soube o que era UFS e rato desde novinha, participou dos experimentos aos finais de semana e quando isso não acontecia, teve que aprender a lidar com a minha ausência. Ela foi o meu combustível nestes últimos dois anos e, apesar das dificuldades que enfrentei, sendo mãe-doutoranda-cientista, eu sempre me pergunto: “Como pude ter vivido tanto tempo sem ela?”. É por você que eu quero chegar longe e por isso vou batalhar todos os dias, para que tenha sempre muito orgulho da sua mamãe. Seremos sempre parceiras, não tenho dúvida disso! Filha, AMO VOCÊ e obrigada por me inspirar e me motivar.

Aos meus pais, pelo grande exemplo de força e de luta que sempre foram para minha vida. É nos olhos de vocês que quero ver brilhar a felicidade e o orgulho de cada conquista que eu alcançar na minha vida. Dizer que vocês são insubstituíveis e essenciais seria pouco. AMO VOCÊS!

Agradeço também aos meus queridos avós Pepe e Lola - in memoriam- por todo amor que sempre recebi. Eu sei que, estejam onde estiverem, estão felizes pelo dia de hoje.

A minha única e querida irmã, obrigada sempre torcer por mim e por estar ao meu lado quando mais precisei.

A minha madrinha, Bel, e a minha tia, Ginha, agradeço a torcida e as palavras de incentivo constantes. Vocês também fazem parte desta conquista.

Ao meu querido orientador e também chefe, por sempre ter demonstrado confiança no meu trabalho com gestos e palavras. Sua tranquilidade me inspira e o seu respeito e atenção para com os outros são grandes exemplos. Te respeito e te admiro muito. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

A todos os membros do LANBAC, que torceram sempre e que também me ensinaram tanto. Em especial as minhas queridas amigas de laboratório Dani, Eddy, Pati e Belle, que nunca mediram esforços para me ajudar. Juntas aprendemos o verdadeiro sentido do trabalho em equipe. Se existem dados nessa tese, isto tem grande e fundamental participação de vocês. Obrigada, de coração, por terem me auxiliado na concretização deste projeto e mais do que isso, por terem dividido os momentos alegres e tristes que envolveram este caminhar. Sentirei saudade, mas tenho certeza que nos encontraremos pela vida.

Ao Prof. Dr. Daniel Badauê por todos os ensinamentos ao longo dessa jornada e por ter aberto as portas do seu laboratório possibilitando que eu convivesse com pessoas incríveis. Você sempre será um exemplo de profissional em muitos aspectos para mim e de sucesso acadêmico.

A Demetrius, obrigada pela disponibilidade em realizar a análise estatística de parte dos dados deste trabalho e mais do que isso, por todos os ensinamentos em estatística. Tenho certeza que serei uma Doutora muito melhor por todo aprendizado que me proporcionou neste âmbito.

Aos meus ICs amados (Lucas, Márcio e Amandinha), ao longo desses anos compartilhamos alegrias, trabalho, madrugadas (o que dizer das idas a UFS às 4h da manhã?) frustrações, conquistas, lágrimas e muitas risadas. Tão novos tiveram

responsabilidades que honraram com maestria. Obrigada por todo ensinamento que me proporcionaram e por todo auxílio na coleta dos dados. Este trabalho também é fruto do esforço de vocês. Por tudo que são e que aprenderam, tenho certeza que serão médicos brilhantes. Tenho muito orgulho de vocês!

Ao membro do LAFAPI mais LANBAC que já vi, Fabíula. Obrigada por toda ajuda na realização do estresse oxidativo. Disponibilizar protocolo e executar experimento para uma colega deveria ser algo comum na academia, mas não é! Por isso, meus sinceros agradecimentos por todo o seu desprendimento e pelo espírito de coletividade. Obrigada também por ser parceira de RESUN e de conversas extra-trabalho.

Ao Prof. Dr. Luís Felipe, que pode acompanhar de perto os problemas metodológicos que enfrentei durante o Doutorado e que, por muitas vezes, me auxiliou a encontrar novas saídas frente às dificuldades inerentes ao processo de pesquisa, o meu muito obrigada.

Ao Eduardo Kalinine, ao Prof. Dr. Diogo Onofre e a todos da UFRGS que estiveram envolvidos na dosagem de glutamato no LCR dos meus animais experimentais, o meu muito obrigada.

Aos alunos para os quais dei aula e ao Departamento de Fisioterapia, serei grata eternamente. Com vocês aprendi e descobri o verdadeiro gosto pela academia.

Os meus sinceros agradecimentos as agências de fomento, especialmente a CAPES, pela bolsa de doutorado, e ao CNPQ, pelo financiamento do projeto.

Por fim, obrigada aos amigos, familiares e a todos aqueles que torceram por mim. Agora, enfim, o meu sonho se tornou realidade!

RESUMO

Alterações das concentrações de hormônios tireoideanos maternos durante a gestação podem afetar o adequado desenvolvimento dos filhotes. No entanto, apesar da corrida recente pela compreensão dos mecanismos que expliquem as repercussões da vida perinatal na ocorrência de distintas doenças, pouco se tem feito para investigar o papel dos hormônios tireoideanos maternos para o adequado desenvolvimento das estruturas do SNC, importantes na regulação da percepção nociceptiva. Nesse sentido, no presente estudo, procurou-se investigar as repercussões do hipotireoidismo gestacional (HGE) materno nos sistemas biológicos centrais de controle nociceptivo. O HGE foi induzido adicionando metimazol a 0,02% na água de beber a partir do nono dia de gestação até o parto. Os machos da prole de mães hipotireoideas (PMH) e eutireoideas (PME) foram submetidos à avaliação basal e após a injeção de drogas (morfina, memantina, sertralina e AMPT), do limiar nociceptivo com 60 dias pós-natal (DPN) por meio do aparato da placa quente ($52 \pm 0,2$ C). Ademais, foi realizada a dosagem da triiodotironina e tiroxina totais (TT3 e TT4, respectivamente) séricos, quantificação de neurônios da substância cinzenta periaquedutal porção ventrolateral (PAGvl) imunomarcados para tirosina hidroxilase, quantificação de glutamato no líquido, além da avaliação de parâmetros oxidativos. Os resultados obtidos foram expressos em valores de média \pm erro padrão da média. Para comparação dos dados entre os grupos foi realizado ANOVA *three* e *two-way* de medidas repetidas, *student t test*, *Mann-withney* e ANCOVA com distância percorrida como co-. O nível crítico fixado foi de 5% ($P < 0,05$). Após análise dos dados foi possível observar que a PMH apresenta menor massa corporal aos 60 DPN ($p < 0,01$), maior concentração sérica de TT3 ($p < 0,05$), maior analgesia na placa quente após a administração i.p. de morfina nos tempos 30 e 60 minutos (fator interação tempo e tratamento ($F(4, 80) = 2,50$; $p < 0,05$) e maior peroxidação lipídica (avaliada pela quantificação do TBARS) na medula espinhal ($p < 0,01$) quando comparada ao grupo controle. Diante do exposto, concluímos que o HGE não gera repercussões importantes nas mães tratadas, quando estas são comparadas as controle, no entanto, a prole sofre importantes efeitos da carência dos hormônios tireoideanos maternos no período intraútero. A carência de HTs no período gestacional acarreta alterações no peso corporal e nas concentrações séricas de TT3, bem como nos sistemas biológicos de controle nociceptivo.

Palavras-chave: hipotireoidismo gestacional; nocicepção; PAG; prole; programação fetal; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Changes in maternal thyroid hormones concentrations during pregnancy can affect the body development of pups. However, despite the recent race for the understanding of the mechanisms that explain the impact of perinatal life in the occurrence of different diseases, little has been done to investigate the role of maternal thyroid hormones for proper development of CNS structures, important in regulating perception nociceptive. In this sense, in the present study we investigate the effect of experimental gestational hypothyroidism (EGH) in biological systems of nociceptive circuitry. The EGH was induced by methimazole to 0.02% in drinking water from ninth day of gestation until delivery. The threshold for noxious temperature was evaluated by using the hot plate apparatus (52 ± 0.2 ° C) in male offspring from methimazole treated dams (OMTD) and offspring from water treated dams (OWTD), on postnatal day (PND) 60 days, in baseline condition and after a drug injection (morphine, memantine, sertraline and AMPT). In addition, thyroid status was evaluated through the determination of total T3 and T4 serum levels on PND 60, sections through the vIPAG were processed for TH immunofluorescence, the contents of glutamate in the cerebrospinal fluid was measured and evaluated oxidative parameters in spinal cord. The results were expressed mean \pm Standard Error values. *Three* and *two* way ANOVA, Student t test, Mann-Whitney and correlation test were used. The threshold of statistical significance was set at $p < 0.05$. Thus, our data showed that EGH does not generate significant impact on the treated mothers when they are compared to control, but in the offspring important effects of lack of maternal THs in the intrauterine period were observed. OMTD had less body weight after 60 DPN ($p < 0.01$), higher serum concentration of TT3 ($p < 0.05$), higher analgesia on the hot plate after i.p. morphine, at times 30 and 60 minutes (time factor interaction and treatment ($F(4, 80) = 2.50$, $p < 0.05$) and increased lipid peroxidation (assessed by quantification of TBARS) in the spinal cord ($p < 0.01$). Given the above, we conclude that the lack of THs during pregnancy causes changes in body weight and serum concentrations of T3, as well as in biological systems of nociceptive circuitry.

Keywords: gestational hypothyroidism; nociception; rats; PAG; offspring; fetal programming; oxidative stress.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Estrutura folicular (Campbell, 2011, 2005)

Figura 2. Estrutura química dos hormônios da tireóide (triiodotironina-T3 e tetraiodotironina-T4).

Figura 3. Produção de T3 (Bianco et al., 2002).

Figura 4. Controle da síntese e secreção de hormônio tireoideano (Aires M, 2008).

Figura 5. Sinalização intracelular do receptor para TSH (Aires M, 2008).

Figura 6. Figura esquemática da estrutura da NIS (Dohán et al., 2003).

Figura 7. Estrutura dos domínios das DUOXs. (Donkó et al., 2005).

Figura 8. Representação simbólica do EF-hand motif. A hélice E está representada pelo indicador e a hélice F pelo polegar. Quando o íon de cálcio se liga ao complexo, a hélice F se move da sua conformação fechada (apoproteína em cinza claro) para a aberta (apoproteína em cinza escuro). Modificado de Lewit-Bentley and Réty, 2000

Figura 9. Representação esquemática da DUOX1 E DUOX2 e de seus ativadores DUOXA1 e DOXA2 (Carvalho & Dupuy, 2013).

Figura 10. Síntese de hormônios tireoideanos (Grasberger, 2010).

Figure 11. Estrutura da megalina (Modificado de (Christensen and Birn, 2002).

Figura 12. Representação esquemática da síntese de hormônios tireoideanos (Bizhanova & Kopp, 2009).

Figura 13. Representação esquemática de D1, D2 e D3 (Bianco, 2004).

Figura 14. Representação esquemática da localização de D1, D2 e D3 (modificado de Araujo & Carvalho, 2011).

Figura 15. Reações básicas de desiodação (Darras & Van Herck, 2012).

Figura 16. Ubiquitinação e desubiquitinação da D2 (Curcio-Morelli et al., 2003).

Figura 17. Estrutura do MCT8 e MCT10 (van der Deure et al., 2010).

Figura 18. Ilustração esquemática do transporte de HTs no cérebro de ratos. (Heuer & Visser, 2013; Schroeder & Privalsky, 2014).

Figura 19. Resumo da expressão dos transportadores transmembrana em varias regioes cerebrais em diferentes espécies (Wirth et al., 2014).

Figura 20. Representação esquemática das isoformas TR α e TR β . A figura mostra os diferentes domínios envolvidos na função dos TRs. Isso inclui o domínio de ligação ao DNA (DBD) e o domínio de ligação ao hormônio (HBD) (carboxi-terminal). Outras regiões funcionais dos TRs incluem o dominio de ligação ao co-fator (located in A/B, D, e E) e o domínio de dimerização (localizado em C e E). A activação do domínio AF-1 e AF-2 são importantes para a ativação transcricional (Sirakov et al., 2014) (Cheng et al., 2010).

Figura 21. Mecanismo de ação dos hotmônios tireoideanos. TR não ligado e heterodimerizado com RXR liga-se a uma unidade responsiva (TER) e em seguida a um co-repressor de receptores nucleares (NCoR) ou SMRT, reprimindo a expressão do gene. Quando o T3 se liga ao TR ocorre interrupção da ligação com o co-repressor e promoção da ligação com o co-ativador, que leva a transcrição gênica. (Brent, 2012; Darras et al., 2014).

Figura 22. Modelo de regulação da transcrição. Na presença de concentrações elevadas de TH (superior direito), a maioria dos receptores ligam TH que induz a alteração conformacional que leva à libertação de co-repressores e recrutamento de coativadores maximamente para activar a transcrição. Em concentrações intermédias de TH correspondentes a um estado eutiroides (média superior), apenas alguns dos receptores ligam o ligando . O complexo entre TR, hormônio, coativadores e co-repressores está em um equilíbrio dinâmico em que atinge a ativação moderada de transcrição. Remoção de co-repressores Neste resultados estaduais para o aumento da disponibilidade de TR para o ligando e coativadores, levando ao aumento da sensibilidade ao hormônio (Astapova & Hollenberg, 2013).

Figura 23. Estrutura da integrina $\alpha V\beta 3$ ($\alpha v\beta 3$) (Cody et al., 2007).

Figura 24. Ação não genômica dos hormônios tireoideanos (Moeller & Broecker-Preuss, 2011).

Figura 25. Estrutura e Nomenclatura das Tironaminas (Piehl et al., 2008).

Figura 26. Formação de T2 (Orozco et al., 2014).

Figura 27. Envolvimentos dos TRs ou receptores alternativos na ação de hormônios tireoideanos não clássicos (Senese et al., 2014).

Figura 28. Linha do tempo da maturação da glândula tireoide em humanos.

Figura 29. Potenciais de ação gerados pelos diferentes tipos de fibras.

Figura 30. Diagrama sistemático de controle da dor via teoria das comportas. SG (substância gelatinosa); T (neurônio de transmissão) (Melzack & Wall, 1965).

Figura 31. Teoria das comportas revisada. Sistemas de controle da dor envolve duas famílias de interneurônio e não somente uma (Calvino & Grilo, 2006).

Figura 32. Um estímulo nocivo vai excitar nociceptores periféricos (fibras delta e C). Estas fibras fazem sinapse com neurônios do corno dorsal segunda ordem. Alguns

desses neurônios do corno dorsal são interneurônios excitatórios ou inibitórios. Outros são neurônios ascendente de projeção espinotalâmico (PN) que sobem através do funículo ventrolateral contralateral para transmitir a sensação de dor para o cérebro. Neurônios do corno dorsal também estão sujeitos a descendente de modulação do cinza periaqueductal mesencéfalo (PAG) através de circuitos polisinápticas através da medula, incluindo através da medula ventromedial rostral (RVM) (Velázquez et al., 2007).

Figura 33. Vias de biossíntese das catecolaminas.

Figura 34. Posicionamento do animal no aparelho estereotáxico para realização da punção da cisterna magna.

Figura 35. Representação da punção da cisterna magna com seringa (Liu et al., 2004)

Figura 36. Reação DTNB/Thiol.

Figura 37. Desenho experimental. DG: Dia de gestação; DPN: dia pós-natal.

Figura 38. Efeito do HGE sobre a duração da gestação. Foram incluídas 17 fêmeas eutireóideas (FE) e 20 fêmeas hipotireóideas (FH). Dados são mostrados como média±EPM Student *t* test.

Figura 39. Efeito do HGE sobre o número de filhotes paridos. Foram incluídas 17 fêmeas eutireóideas (FE) e 20 fêmeas hipotireóideas (FH). Dados são mostrados como média±EPM Student *t* test.

Figura 40. Efeito do HGE sobre o peso corporal das mães, antes (0DG), no início do tratamento (9 DG) e onze dias após o tratamento com MTZ (20DG) . Foram incluídas 17 fêmeas eutireóideas (FE) e 20 fêmeas hipotireóideas (FH). Dados são mostrados como mediana± intervalo interquartil. *Mann Whitney test*.

Figura 41. Efeito do HGE sobre a massa corporal aos 60DPN da prole de mães eutireóideas (PME) e hipotireóideas (PMH). Grupo Controle (prole de mães eutireóideas (PME), n=44) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas (PMH), n=46). Dados são mostrados como mediana± intervalo interquartil. (**) $p<0.01$, *Mann Whitney test*.

Figura 42. Efeito do HGE nas concentrações séricas de (A) tiroxina total (TT4) e (B) triiodotironina (T3) na prole aos 60 DPN. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas (PME), n=8) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas (PMH), n=6). Dados são mostrados como média±EPM. (*) $p<0.05$, *Student t test*.

Figura 43. Efeito do HGE sobre a nocicepção térmica da prole aos 60 DPN antes e após a injeção i.p. 30,60,90 e 120min após a morfina. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], n=13) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=11). Dados são mostrados em média±EPM. (*) $p<0,05$, (***) $p<0.001$, *Anova two-way*, Bonferroni *post hoc test*.

Figura 44. Efeito do HGE sobre a nocicepção térmica (A) na placa quente e a distancia percorrida (B) no campo aberto da prole aos 60 DPN antes e 30 min após a injeção i.p. de Sertralina nos dias 0,3 11 e 21 de tratamento. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], n=9) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=9). Dados são mostrados em média±EPM. *Anova two-way*, seguido do Bonferroni *post hoc test*.

Figura 45. Efeito do HGE sobre a nocicepção térmica (A) na placa quente e a distancia percorrida (B) no campo aberto da prole aos 60 DPN antes e 3 horas após a injeção i.p. de AMPT. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], n=10) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=10). Dados são mostrados em média±EPM. *Anova two-way*, seguido do Bonferroni *post hoc test*.

Figura 46. Efeito do HGE sobre o número de neurônios positivos para Tirosina hidroxilase na PAG ventrolateral aos 60 DPN. Grupo Controle (prole de mães

eutireóideas [PME], n=6) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=6). Dados são mostrados em $\text{media} \pm \text{EPM}$. *Student t test*.

Figura 47. Efeito do HGE sobre a nocicepção térmica (A) na placa quente, distancia percorrida (B) no campo aberto e correlação entre distância percorrida e latência na placa quente (C) da prole aos 60 DPN antes e 30 min após a injeção i.p. de Memantina. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], n=8) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=8). Dados são mostrados em $\text{media} \pm \text{EPM}$. *Anova two-way*, seguido do Bonferroni *post hoc test*.

Figura 48. Efeito do HGE sobre o conteúdo de glutamato no LCR na prole aos 60 DPN. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], n=6) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=6). $p < 0.01$, *Student t test*.

Figura 49 Efeito do HGE sobre parâmetros oxidantes na medula espinhal da prole aos 60 DPN. Painel A: Sulfidril; Painel B: Nitrito; e Painel C: T-bars. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], n=8) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=8). (*) $p < 0.05$, *Student t test*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACE	American Association of Clinical Endocrinologists
ACC	Córtex cingulado anterior
Ach	acetilcolina
AchE	acetilcolinesterase
ACOG	American College of Obstetrcians and gynecologists
AES	Sociedade Americana de Endocrinologia
AHDS	Síndrome Allan-Herndon–Dudley
Akt	Proteína Kinase
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPA	ácido- α -amino-2,3,-dihidro-5-metil-3-oxo-4-isoxazolepropiónico
AMPT	A-metil-p-tirosina, Inibidor da Tirosina Hidroxilase
ATA	American Thyroid Association
ATP	Adenosida Trifosfato
BAT	Brown Adipose Tissue
BCA	Bicinchoninic Acid
BFCES	Barreira Fluido Cerebroespinal-Sangue
BHE	Barreira Hematoencefálica
BSA	Albumina de Soro Bovino
BTA	British Thyroid Association
cAMP	Adenosina Monofosfato cíclica
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
CLC-5	Canal de Cloreto tipo 5
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimnetação Animal
CoRs	Proteínas Correpessoras

COS-1	CV-1 in Origin with SV40 genes
D1, D2, D3	Desiodases tipo 1, 2 e 3
DAG	Diacylglicerol
DBCA	Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e utilização de Animais
DEHAL	Dehalogenase Tirosina
DG	Dia de Gestação
DIT	Diiodotirosina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOP	Receptor delta Opiode
DPN	Dia Pós-Natal
DRIP	Vitamin D Receptor interacting Protein
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
DUOX 1 e 2	Dual-oxidase 1 e 2
DUOXA	Fator de maturação da Dual-oxidase
E8- E20	Intervalo entre o oitavo e o vigésimo dia embrionário
ECSWSB-1	Complexo BC-Elongin Cullin5-RBX1
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EPM	Erro Padrão da Média
ES	Endocrine Society
FAD	Dinucleotideo de Flavina e Adenina
FCE	Fluido Cerebroespinal
FE	Fêmea Eutireoidea
FH	Fêmea Hipotireoidea
GABA	ácido gama-aminobutírico
GDP	Guanosina Difosfato

GH	Hormônio do crescimento
GLAST	Transportador de Glutamato Astrocitário
GLS1	Glutaminase ativada por fosfatase tipo 1
GLTs	Transportadores de Glutamato
GTP	Guanosina Trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
hAIT	Transportador humano Apical Iodeto
hCG	gonadotrofina coriônica
HDACs	Histone Deacetylases
HDB	Sítio de ligação ao ligante
HGE	Hipotireoidismo Gestacional Experimental
HIF-1	Fator Indutor de Hipóxia
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HTs	Hormônios Tireoideanos
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
i.p.	Intraperitoneal
IGF	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
K _m	Constante de Michaelis-Menten
KO	Knockout
KOP	Receptor kappa Opioide
LANBAC	Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental
LAT	Transportadores de Aminoácidos tipo L
LAT1	Transportadores de Aminoácidos tipo L subtipo 1
LATS	Sociedade Latino Amricana de Tireoide
LC	Locus Caeruleus

LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LDL	Low Density Lipoprotein
MAPK/ERK1/2	Via serina–threonina kinase
MCT	Transportador de Monocarboxilato
MCT10	Monocarboxylate Transporter 10
MCT8	Monocarboxylate Transporter 8
MDA	Malonildialdeído
MIT	Monoiodotirosina
MOP	Receptores mu Opioides
MTZ	Metimazol
NA	Noradrenalina
Na ⁺	Íon sódio
NDR	núcleo dorsal da rafe
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato
NCoR	Nuclear Hormone Receptor-Corepressor
NE	Norepinefrina
NIS	Simportador Sódio-Iodo
NMDA	Receptor de glutamato N-methyl- D-aspartate
NMR	núcleo magno da rafe
NO	óxido nítrico
NOX NADPH	Oxidases
NR	Receptores Nucleares
Ntcp	Co-transportador de Na ⁺ /taurocholate
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide
OATP1C1	Organic Anion Transporting Polypeptide 1C1
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal

PAGvl	Substância Cinzenta Periaquedutal ventrolateral
PB	Tampão Fosfato
PBN	núcleo parabraquial
PBS	Solução Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PET	Tomografia por transmissão de elétrons
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfoinositídeo-3-quinase
PIG	Pequeno para a Idade Gestacional
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína Kinase A
PKC	Proteína Kinase C
PLC	Fosfolipase C
PME	Prole de Mães Eutireoideas
PMH	Prole de Mães Hipotireoideas
PTU	Propiltiouracil
p70s6k	Proteína Kinase
QI	Quociente de Inteligência
RGD	Arginina-Glicina-Aspatato
RIE	Radioimunoensaio
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ribonucleic Acid messenger
ROS	Oxygen-Reactive Species
rpm	Rotações Por Minuto
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
rT3	T3 reverso ou 3,3',5'-triiodotironina

RVM	Rostral Ventromedial Medulla
RXR	Receptor Retinóide X
S1 e S2	Sítios de ligação a HT
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
SEEN	Sociedade Espanhola de Endocrinologia e Nutrição ()
SH	Grupamento químico tiol
SLC	Proteínas Transportadoras de Solutos
SLC26A4	Solute Carrier 26A4
SLC5A	Família transportadora de soluto 5A
SMRT	Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Hormone Receptors
SNC	Sistema Nervoso Central
SS	Somatostatina
SSRIs	Inibidores da Recaptação de Serotonina
SUS	Sistema Único de Saúde
6-OHDA	6- hydroxydopamine
T1AM	3 - Iodothyronamine
T2	3,5-diiodo-L-thyronine
T3	Triiodotironina ou 3,5,3'- triiodotironina
T3S e T4S	Iodotironinas Sulfatadas
T4	Tiroxina ou 3,5,3',5'- tetraiodotironina
TAAR1	Receptor Associado a Amina Traço 1
TAMs	Thyronaminas
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Substances
TBG	Tyroxine-Binding Globulin
TBPA	Thyroid-Binding Pre-Albumin

TCA	Ácido Tricloroacético
TES	The Endocrine Society
TG	Tireoglobulina
TH	Tirosina Hidroxilase
THOX	Thyroid Oxidases
THR α (NR1A1)	Gene codificador do Receptor α de Hormônios Tireoideanos
THR β (NR1B1)	Gene codificador do Receptor β de Hormônios Tireoideanos
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
TPO	Tireoperoxidase
TRAP	Complex of proteins dependent transcription activators of TR
TRE	Elementos Responsivos a Hormônio Tireoideanos
TRH	Hormônio Liberador de Tireotrofina
TR α	Receptor alfa de Hormônio Tireoideano
TR α 1, TR α 2 e TR α 3	Isoformas do Receptor α de Hormônios Tireoideanos
TR β 1, TR β 2, TR β 3 e TR β 4	Isoformas do Receptor β de Hormônios Tireoideanos
TR $\Delta\alpha$ 1 e TR $\Delta\alpha$ 2	Receptores de Hormônios tireoideanos truncados
TSH	Hormônio Tireoestimulante
TSHR	Receptor de TSH
TTR	Transtirretina
TT3	Triiodotironina total
TT4	Tireoxina Total
UBC6 e 7	Ubiquitina Ligase E2 6 e 7
UFS	Universidade Federal de Sergipe
USA	United States of America
USPs	Ubiquitin-Specific Proteases
USPSTF	United States Preventive Services Task Force

VDUs	Von Hippel-Lindau Deubiquitinating
WSB-1	Parte da ubiquitina ligase E3
$\alpha\beta3$	Integrina Específica alfaVbeta3
1A2, 1B3 e 1C1	Subunidades de OATPs
5'D1 e 5'D2	Desiodase tipo 1 e 2
5-HT	5-Hidroxitriptamina ou serotonina
5-HTT	Transportador seletivo de serotonina

Sumário

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1. HORMONIOS TIREOIDEANOS.....	21
2.1.1. A glândula tireoide.....	21
2.1.2. Sistema hipotálamo-hipófise-tireóide.....	24
2.1.3. Geração de T3 e T4.....	26
2.1.4. Transporte dos HTs na corrente sanguínea.....	36
2.1.5. Geração periférica de T3 a partir de T4.....	36
2.1.6. Transportadores de membrana.....	42
2.1.7. Receptores intra-celulares – Ação genômica.....	52
2.1.8. Ação não genômica.....	58
2.1.9. Hormônios tireoideanos “não clássicos”.....	60
2.2.DESENVOLVIMENTO DA TIREOIDE.....	64
2.2.1. Humanos.....	64
2.2.2. Ratos.....	67
2.3. INDUÇÃO DO HIPOTIREOIDISMO.....	69
2.4. TIREOIDE E GESTAÇÃO.....	69
2.5. HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL E REPERCUSSÕES NA PROLE.....	74
2.6. CIRCUITARIA DE DOR.....	80
2.6.1. Nociceptores: os sensores das vias de dor.....	80
2.6.2. Transmissão da dor	82
2.6.3. Modulação da dor.....	88
2.6.4. Influências descendentes facilitatórias.....	95
2.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97

3. OBJETIVOS.....	98
4. JUSTIFICATIVA.....	99
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	100
5.1. Animais utilizados.....	100
5.2. Drogas utilizadas e protocolo de indução do hipotireoidismo gestacional experimental.....	101
5.3. Acompanhamento das mães.....	101
5.4. Acompanhamento da prole.....	101
5.5. Dosagem de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4)	102
5.5.1. Coleta de sangue para dosagem de T3 e T4.....	102
5.5.2. Radioimunoensaio (RIE) para T3 e T4 totais.....	102
5.6. Imunofluorescência.....	102
5.6.1. Perfusão transcardíaca.....	102
5.6.2. Imunomarcção de Tirosina Hidroxilase (TH) na substância cinzenta periaquedutal porção ventrolateral (PAGvl)	104
5.6.3. Análise de imagem.....	105
5.7. Testes comportamentais.....	105
5.7.1. Mensuração da nociceção térmica seriada com morfina.....	105
5.7.2. Mensuração da nociceção térmica após manipulação farmacológica crônica.....	106
5.7.3. Campo aberto.....	108
5.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	109
5.8.1 Coleta do fluido cerebrospinal da cisterna magna.....	109
5.8.2. Quantificação do conteúdo de glutamato no líquido cerebrospinal.....	110
5.9. Avaliação dos parâmetros oxidativo.....	111
5.9.1 Coleta da medula espinhal.....	111
5.9.2. Parâmetros oxidativos na medula espinhal.....	111
5.9.2.1 Determinação do grau de peroxidação lipídica.....	111
5.9.2.2 Determinação do grau de peroxidação protéica.....	112
5.9.2.3 Determinação do conteúdo de nitrito medular.....	114
5.9.2.4 Dosagem de proteínas.....	114
5.10. Desenho experimental.....	116

5.11. Análise estatística.....	116
6. RESULTADOS.....	118
7. DISCUSSÃO.....	127
8. CONCLUSÃO.....	145
9. PERSPECTIVAS.....	145
REFERÊNCIAS.....	147
ANEXO A.....	186
ANEXO B.....	187

1.INTRODUÇÃO

Inúmeras desordens orgânicas, comumente diagnosticadas atualmente, não têm suas etiologias seguramente determinadas (i.e: hipertensão essencial, fibromialgia, doenças autoimune). Neste contexto, recentes abordagens experimentais têm imputado valor aos eventos ocorridos durante a vida intrauterina como decisiva no aparecimento destas doenças em diferentes momentos da vida pós-natal (Entringer et al., 2013, 2011; Fowden & Forhead, 2004; McMillen & Robinson, 2005; Pitale & Sahasrabuddhe, 2011; Saad et al., 2016; Tellechea et al., 2015).

O desenvolvimento intrauterino é um processo complexo e dinâmico que se caracteriza pela interação de fatores maternos e fetais. O desenvolvimento fetal adequado depende de condições ideais para a manutenção dos altos índices de proliferação, crescimento e diferenciação celular, característicos desse processo. Assim, distúrbios no suprimento de macro e micro nutrientes, oxigênio e hormônios durante a gestação, ou a exposição indevida a agentes potencialmente tóxicos, podem comprometer o desenvolvimento do feto e resultar em consequências na sua vida adulta (Fowden & Forhead, 2004; Warner & Ozanne, 2010).

A deficiência na produção ou na atuação dos hormônios tireoideanos (HTs) leva ao quadro de hipotireoidismo (Patel et al., 2011). A disfunção tireoidiana é um problema de saúde comum, sobre o qual ainda existem inúmeras controvérsias acerca da triagem, avaliação e controle da doença (Gharib et al., 2005). A prevalência do hipotireoidismo é variável e depende de alguns fatores, tais como região, sexo e faixa etária. Na população em geral, essa prevalência está em torno de 4% a 10%, sendo sua maior ocorrência no sexo feminino (Rosenthal et al., 1987; Sawin et al., 1985; Tunbridge et al., 1977; Vanderpump et al., 1995).

Durante a gestação, com a modificação do limite superior de normalidade para o hormônio tireoestimulante (TSH) (Sgarbi et al., 2013; Stagnaro-Green et al., 2011), estima-se que prevalência de hipotireoidismo (clínico e subclínico) esteja em torno de 5,5% a 15% (Blatt et al., 2012; Ong et al., 2014a). Esta pode variar em cada país, sendo importante destacar que já foi identificado uma prevalência de hipotireoidismo

declarado e subclínico de 34,5%, em gestantes do Egito (Ahmed et al., 2014). No Brasil, ainda não existe um levantamento atual a respeito da prevalência do hipotireoidismo em mulheres durante a período gestacional.

Durante o período gestacional, o feto ainda não se encontra completamente apto a suprir, sozinho, as suas necessidades de HTs; assim, os HTs maternos são essenciais para o adequado desenvolvimento deste (Fisher & Klein, 1981; Hume et al., 2004; Thorpe-Beeston et al., 1991; Vulsma et al., 1989). O sistema nervoso central fetal depende de tiroxina para o seu desenvolvimento durante toda a gestação (Gärtner, 2009). Vários fenômenos do desenvolvimento (e da vida adulta) são influenciados pelos HTs, como: crescimento axonal e neurítico, sinaptogênese, migração e sobrevivência neuronal, mielinização e eficácia sináptica (Thompson & Potter, 2000). Na ontogênese cerebelar, por exemplo, experimentos mostraram que os hormônios tireoideanos atuam na mediação do fator de crescimento epidermal (EGF), propiciando um aumento no número de astrócitos (Martinez & Gomes, 2002).

A regulação da liberação de neurotransmissores no hipocampo também se mostrou influenciada pela presença de HTs (Vara et al., 2002). Estes autores mostraram que as concentrações de sinapsina I e sinaptotagmina estão reduzidas no hipocampo de ratos hipotireoideos no período neonatal. Investigações sobre a proliferação celular na zona sub-ventricular do hipocampo também mostraram que o T3 e seu receptor alfa ($TR\alpha$) desempenham importante papel na neurogênese desta região (Lemkine et al., 2005). Efeitos dos HTs na síntese da matriz extracelular também foram observados no cerebelo. A ausência dos hormônios tireoideanos, no cerebelo foi responsável por atraso na expressão de laminina (proteína da lâmina basal) e redução dos seus níveis quando comparado ao grupo controle (Farwell et al., 1995).

A deficiência dos HTs durante a vida intrauterina e no período pós-natal mantém a imaturidade do SNC, leva a hipoplasia dos neurônios corticais, atrasa a mielinização e reduz a vascularização encefálica e a eficácia sináptica (Ausó et al., 2004; Berbel et al., 2001, 1994; C. Chen et al., 2012; Gilbert et al., 2007; Goodman & Gilbert, 2007; Martínez-Galán et al., 1997; Mohan et al., 2012; Thompson & Potter, 2000; Wang et al.,

2016). Se a reposição hormonal não se fizer de imediato após o nascimento, essas lesões podem tornar-se irreversíveis, com prejuízo no desenvolvimento neuropsicomotor (Glinioer, 1999). Mesmo quedas sutis de T4 ou elevados níveis de TSH na gestante, podem resultar em prejuízo cognitivo para a prole (Goodman & Gilbert, 2007; Pearce & Stagnaro-Green, 2010).

Clinicamente, estudos indicam que filhos de mães com hipotireoidismo descompensado durante a gestação podem apresentar significativo decréscimo do quociente de inteligência (Glinioer, 1999, 1998; Morreale de Escobar et al., 2000). Neonatos expostos a níveis consideravelmente reduzidos de HTs durante a vida uterina apresentam, posteriormente, retardo do crescimento, defeitos neurológicos e desempenho reduzido em diversas habilidades cognitivas (Shibutani et al., 2009). Adicionalmente, a deficiência de HTs durante a gestação reduz o número de células neuronais e afeta severamente as suas interações sinápticas (Koibuchi & Chin, 2000).

A ação dos hormônios da tireóide sobre o sistema nervoso central ocorre, principalmente, do período intrauterino até os dois primeiros anos de vida. As consequências específicas da deficiência dependem do período e gravidade da exposição (Chan & Rovet, 2003). Dados pioneiros na literatura sobre a relação entre hipotireoidismo gestacional e alterações nociceptivas na prole de ratos foram recentemente publicados pelo nosso grupo. Neste estudo foi evidenciado que os ratos filhos de mães com hipotireoidismo gestacional apresentaram hipersensibilidade térmica desde a idade neonatal até a fase adulta (7, 15, 23, 30, 60 e 120 dias pós-natais) quando comparados aos ratos filhos de mães eutireoideas durante o período gestacional (Alves et al., 2013).

Todos estes dados em conjunto reforçam a necessidade da avaliação dos níveis de hormônios tireoideanos em mulheres gestantes e o tratamento do hipotireoidismo durante a gestação. No entanto, apesar das evidências recentes apontando para as repercussões do hipotireoidismo materno na prole, até o presente momento, dentre as principais sociedades científicas de especialistas na área (*American Association of Clinical Endocrinologists –AACE; American College of Obstetricians and Gynecologists –ACOG; American Thyroid Association –ATA; British Thyroid*

*Association –BTA; The Endocrine Society – TES; e United States Preventive Services Task Force – USPSTF, Sociedade Latino Americana de Tireoide – LATS, Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia - SBEM), apenas alguns membros da American Endocrinology Society (AES) recomendam a dosagem do hormônio tireoideano (tetraiodotironina – T4, na sua fração livre) e do hormônio tireoestimulante (TSH) de rotina em todas as mulheres gestantes durante o pré-natal (*screening universal*) (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2015; Amouzegar et al., 2014; Brenta et al., 2013; De Groot et al., 2012; Lazarus et al., 2014; Mintziori & Goulis, 2015; Negro & Stagnaro-Green, 2014a; Sgarbi et al., 2013; Stagnaro-Green et al., 2011). As demais sociedades, supracitadas, recomendam a dosagem destes hormônios durante a gestação apenas se houver história pessoal ou familiar de doença da tireoide. No entanto, é importante destacar que, esta estratégia (*screening* seletivo) pode deixar de diagnosticar e tratar de 33 a 81% das mulheres gestantes com hipotireoidismo (Horacek et al., 2010; Jiskra et al., 2011; Vaidya et al., 2007; Wang et al., 2011; Yang et al., 2014) e os prejuízos disto podem ser irreversíveis para os descendentes.*

Assim, em suma, é possível observar que a função normal da tireoide durante a gestação é importante tanto para a mãe quanto para a prole, já que a carência de hormônios tireoideanos pode gerar complicações para ambos (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2015; Amouzegar et al., 2014; Brenta et al., 2013; De Groot et al., 2012; Lazarus et al., 2014; Mintziori & Goulis, 2015; Negro & Stagnaro-Green, 2014; Sgarbi et al., 2013; Stagnaro-Green et al., 2011). Ademais, como demonstrado anteriormente, alguns relatos já evidenciaram o efeito do hipotireoidismo no desenvolvimento do SNC e em diversos outros órgãos e sistemas. Mais recentemente, estudo experimental foi desenvolvido a fim de avaliar a resposta a estímulos nociceptivos térmicos e mecânicos, em ratos filhos de mães hipotireóideas (Alves et al., 2013). Porém, até o presente momento, o efeito do hipotireoidismo gestacional experimental nas circuitarias opioidérgica, serotoninérgica, glutamatérgica, noradrenérgica e dopaminérgica da prole ainda não foi investigado.

Apesar do esforço recente pela compreensão dos mecanismos que expliquem as repercussões da vida perinatal na ocorrência de distintas doenças, pouco se tem feito

para investigar o papel dos hormônios tireoideanos maternos para o adequado desenvolvimento das estruturas do SNC, importantes na regulação da percepção nociceptiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1.HORMONIOS TIREOIDEANOS

2.1.1. A glândula tireoide

Os HTs, produzidos pela glândula tireoide, desempenham um papel essencial no crescimento e desenvolvimento de diversos órgãos e tecidos, tanto na vida embrionária quanto após o nascimento. A larga distribuição de receptores de HTs em todos os tecidos do organismo representa a importância destes hormônios no desenvolvimento e função dos mesmos.

A tireoide é uma das maiores glândulas endócrinas e pesa cerca de 20 g. Consiste em dois lóbulos que se encontram de cada lado da traqueia e os dois lóbulos estão ligados por um parênquima glandular conhecido como o istmo, que se encontra na parte da frente da traqueia imediatamente abaixo da laringe (Aires M, 2008). Para o seu peso, a glândula tireoide tem uma das fontes mais ricas de sangue de qualquer órgão ou tecido do corpo e uma grande capacidade de crescimento (Campbell, 2011, 2005). A tireoide encontra-se apoiada sobre a traqueia anterior, na altura da cartilagem cricóide. Na sua face dorsal, encontram-se os dois pares de glândulas paratireóides (superior e inferior) (Aires M, 2008).

A glândula recebe inervação simpática, oriunda do gânglio cervical e parassimpática, proveniente do nervo vago (Aires M, 2008).A irrigação sanguínea ocorre pelas artérias tireóideas superiores e inferiores, ramos da carótida e sua drenagem é feita pelas veias tireóideas, que desembocam na veia jugular (Aires M, 2008). Histologicamente, a tireóide é composta por aproximadamente três milhões folículos de 50 a 500µm de diâmetro, que são a unidade funcional desta glândula (Aires M, 2008). Este folículo é uma estrutura de parede cística, constituída por uma única camada de células epiteliais especializadas, em forma cuboide, denominada tireócitos ou células foliculares. O folículo tireoideano possui o lúmen preenchido por um material rico em proteínas, conhecido como coloide. O principal constituinte do colóide é tireoglobulina (TG), uma glicoproteína de alto peso molecular sintetizada no retículo endoplasmático dos tireócitos (figura 1). A parte de carboidrato da molécula de TG é adicionado pelo complexo de Golgi das células foliculares (Campbell, 2011, 2005; Stathatos, 2012).

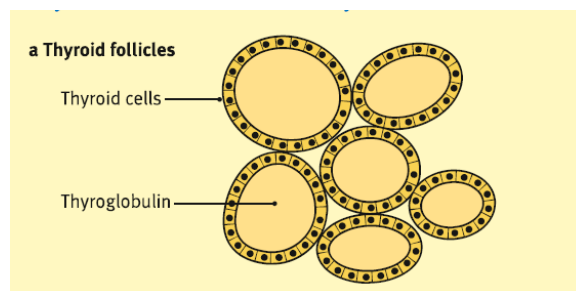


Figura 2. Estrutura folicular (Campbell, 2011, 2005)

A membrana basal do folículo constitui o limite externo dele e está em contato próximo aos capilares e a membrana apical com microvilosidades está voltada para o lúmen (Aires M, 2008). O confinamento do coloide é garantido pelas junções intercelulares, principalmente pela presença da zônula de oclusão na extremidade apical, seguido da zônula de adesão onde se ancoram filamentos de actina, formando um cinturão. A célula folicular apresenta ainda desmossomos esparsamente distribuídos onde se ancoram filamentos de queratina e junções de comunicação gap (Aires M, 2008).

É importante ressaltar que o parênquima tireoidiano além das células foliculares é composto por células C ou parafoliculares que localizam-se entre os espaços interfoliculares ou ocupam a parede folicular e participam da homeostase do cálcio, secretando calcitonina em resposta ao aumento da calcemia (Aires M, 2008).

A tireóide produz 3,5,3',5'- tetraiodotironina (tiroxina ou T4) e 3,5,3'- triiodotironina (T3) que são lançados na corrente sanguínea (figura 2). É importante ressaltar que, em humanos, aproximadamente 80% da produção da tireoide é de T4, 20% da produção desta é de T3 (Maia et al., 2011a) a forma ativa do hormônio da tireoide, e que menos de 1% da produção da tireoide é de 3,3',5'-triiodotironina (T3 reverso ou r T3), uma forma inativa (figura 3). Em ratos, a glândula tireoide é responsável por sintetizar e secretar de 40% (Bianco et al., 2002) a 50% de todo o T3 circulante (Maia et al., 2011a).

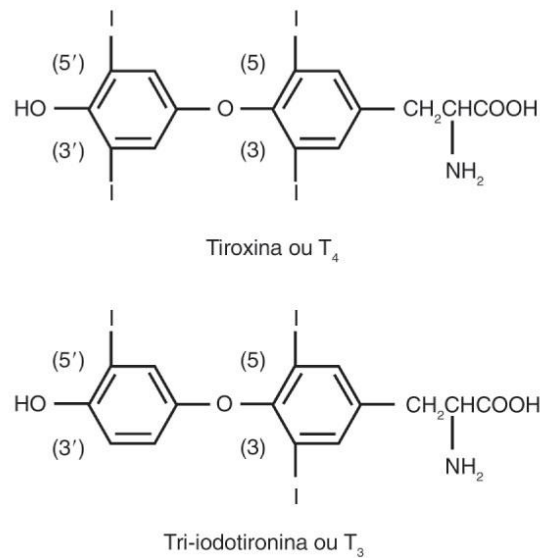


Figura 2. Estrutura química dos hormônios da tireóide (triiodotironina-T3 e tetraiodotironina-T4).

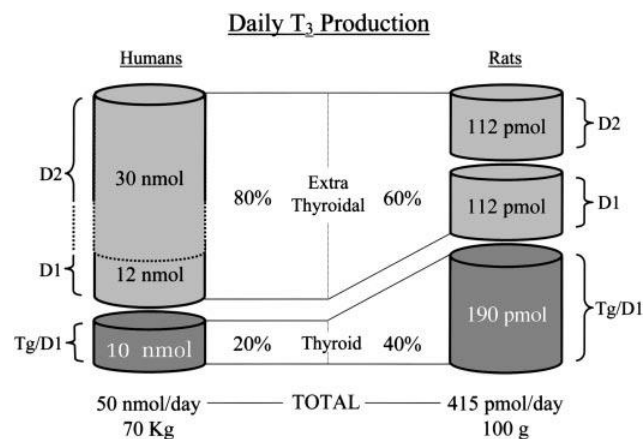


Figura 3. Produção de T3 (Bianco et al., 2002).

O T3 possui atividade cerca de cinco vezes maior que T4, sendo assim o principal hormônio tireoidiano circulante responsável pelo crescimento e diferenciação dos órgãos e tecidos na vida adulta.

Neste contexto, a manutenção de taxas adequadas de T3 torna-se essencial para a qualidade de vida do indivíduo. A manutenção dos níveis adequados circulantes deste hormônio depende de dois mecanismos: 1. mecanismos centrais de controle da atividade tireoidiana, o que requer o bom funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide e; 2. da geração periférica de T3 a partir de T4 promovida pelas enzimas 5'D1 e

5'D2, que estão expressas em diversos tecidos incluindo o SNC (Antunes-Rodrigues, 2005).

2.1.2. Sistema hipotálamo-hipófise-tireóide

A circulação porta-hipotálamo-hipofisária, composta por duas redes de capilares localizadas na eminência mediana (base do hipotálamo), conecta duas estruturas essenciais para o controle da função tireoidiana, o hipotálamo e glândula hipófise. Neurônios localizados nos núcleos paraventriculares e periventriculares do hipotálamo, estabelecem sinapses com estes capilares. Sob o estímulo adequado, estes neurônios liberam hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e somatostatina (SS) para os capilares, que levam estes hormônios hipotalâmicos para a adeno-hipófise (hipófise anterior). Lá eles se ligam aos receptores de membrana presentes nos tireotrofos (células da hipófise). Os tireotrofos são responsáveis, a partir do estímulo do TRH, por produzir hormônio tireoestimulante (TSH) ou tireotrofina. Em contrapartida a síntese de TSH é inibida pela SS. A tireotrofina ou TSH estimula os tireócitos (células da tireóide) a produzir T3 e T4, que em concentrações elevadas, através do mecanismo de *feedback* negativo, inibem a liberação de TRH, pelo hipotálamo, e de TSH, pela hipófise, e desta forma a homeostase é mantida (figura 4) (Antunes-Rodrigues, 2005).

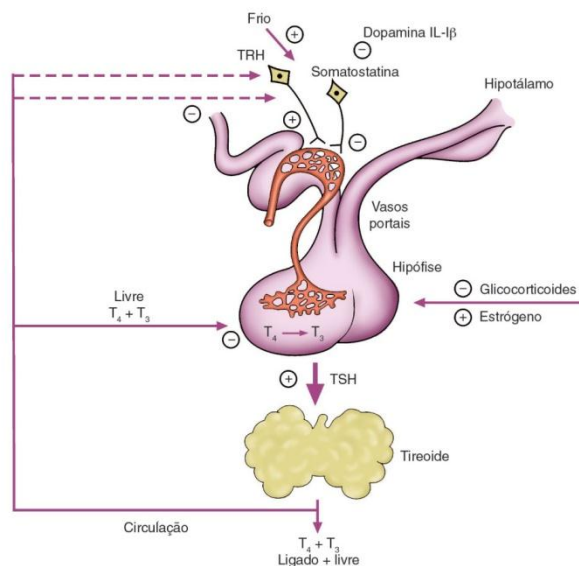


Figura 4. Controle da síntese e secreção de hormônio tireoideano (Aires M, 2008).

O TSH estimula a célula folicular da tireoide quando se acopla ao receptor de TSH (TSHR) localizado na membrana basal do tireócito. O TSHR é um receptor com sete domínios transmembranas (Narumi & Hasegawa, 2015), três alças intracelulares e três extracelulares. Receptores glicohormonais, incluindo TSH, tem um domínio de ligação ao ligante extracelular grande (Narumi & Hasegawa, 2015). Assim, o TSH se liga à alça extracelular aminoterminal e a região carboxiterminal está localizada intracelularmente. Esta ligação estimula várias vias de sinalização, intermediada pela proteína G que se encontra associada ao receptor (Narumi & Hasegawa, 2015). Assim, a GDP ligada a proteína G, é substituída por GTP o que ocasiona a dissociação da subunidade α da proteína Gs e Gq. Esta subunidade da proteína Gs irá ativar a adenililciclase enquanto a proteína Gq fosforila e ativa a fosfolipase C. A adenililciclase estimula a conversão de ATP para AMP cíclico (cAMP) que por sua vez fosforila e ativa a proteína kinase A (PKA). Além disso, a fosfolipase C estimula a conversão de fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP₂) para inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) com liberação de Ca^{2+} , o que ativa a proteína kinase C (PKC) (figura 5). A ativação desta via de sinalização intracelular, culmina no estímulo a síntese e secreção de HT, promovendo a captação e entrada de iodeto no folículo, síntese do co-transportador sódio-iodeto (NIS), TG e TSHR, a iodação da TG, reabsorção do coloide, geração de H_2O_2 e secreção de T3 e T4 (Narumi & Hasegawa, 2015).

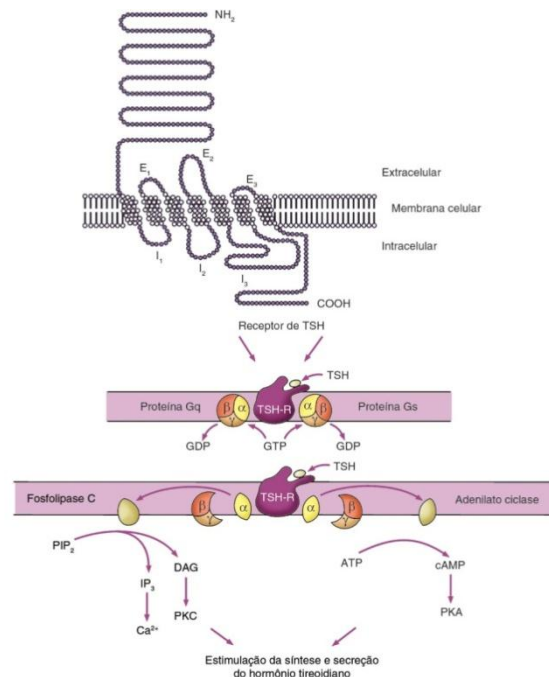


Figura 5. Sinalização intracelular do receptor para TSH (Aires M, 2008).

Toda esta regulação neurohumoral encontra-se integrada a sinais centrais (provenientes de áreas do sistema nervoso central) e periféricos (representados por metabólitos e hormônios), que desencadeiam a resposta de ativação ou inibição das atividades deste sistema.

2.1.3. Geração de T3 e T4

O TSH interfere em todas as etapas da biossíntese e secreção dos hormônios tireoidianos (T3 e T4). A biossíntese dos HTs ocorre nas células foliculares tireoidianas e se inicia com o transporte ativo de iodeto, dado pelo estímulo do TSH. Este processo ocorre por meio de uma proteína localizada na membrana basal e basolateral, o co-transportador $2\text{Na}^+/1\text{I}^-$ conhecido como NIS, que transporta 2 íons de Na^+ e 1 de iodeto para o interior da célula tireoidiana (Bizhanova & Kopp, 2009; Mihai, 2011)

A NIS é uma proteína com 13 domínios transmembranas com a extremidade aminoterminal situada extracelular e carboxiterminal situada intracelularmente (figura 6) (Hingorani et al., 2010). NIS pertence à família transportadora de soluto 5A (SLC5A) (Bizhanova & Kopp, 2009). A regulação primária de NIS é através do hormônio estimulante da tireóide (TSH) e dos níveis de iodo em circulação via mecanismos transcricionais e pós transcricionais (Bizhanova & Kopp, 2009). Assim, por exemplo, o rápido aumento nos níveis de iodeto leva a redução de incorporação de iodeto (promovendo o efeito Wolff-Chaikoff), que é um mecanismo de proteção contra sobrecarga desta substância (Mihai, 2011). *In vivo*, dados sugerem que alta concentração de iodeto sérico levam uma redução dos níveis tanto do RNAm da NIS quanto da própria proteína (Eng et al., 2001, 1999). Mutação na proteína NIS promove um defeito no transporte de iodeto, levando a um quadro de hipotireoidismo (Bizhanova & Kopp, 2009; Dohán et al., 2003).

Neste sentido, mais recentemente, foi sugerido o papel da pendrina no mecanismo de Wolff-Chaikoff. Calil-Silveira et al., (2016) evidenciaram, em células da tireoide de ratos, que em condições de excesso de iodeto ocorre aumento no efluxo de iodeto e aumento na quantidade e tempo de meia vida da pendrina. Esses dados em

conjuntos sugerem o papel da pendrina em mediar o efluxo de iodeto em tireocitos, especialmente em condições de excesso de iodeto.

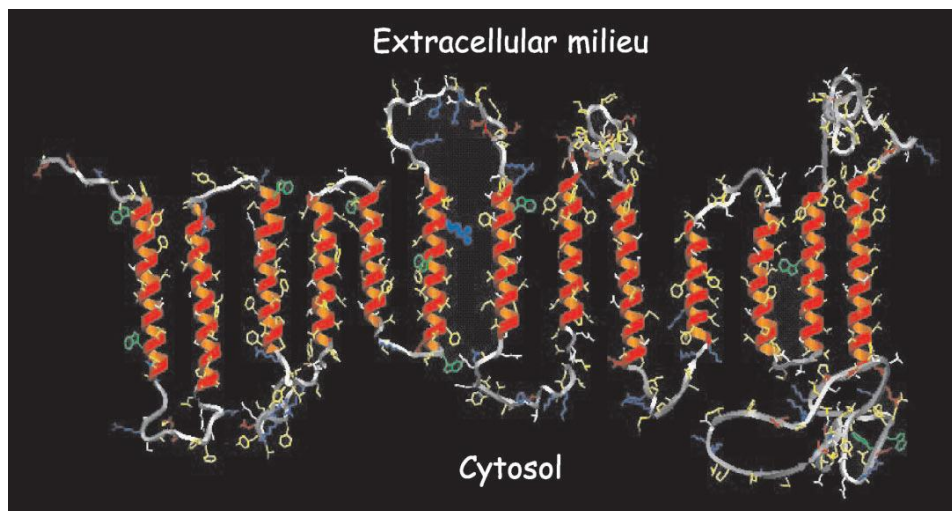


Figura 6. Figura esquemática da estrutura da NIS (Dohán et al., 2003)

Na sequência, após a entrada do iodeto na glândula via membrana basal, este vai para a membrana apical dos tireócitos e é transportado para o lúmen dos folículos por um canal de ânions cloreto-iodeto, a pendrina (Aires M, 2008; Mihai, 2011). A pendrina pertence à família SLC26A, que inclui vários transportadores de ânions (Bizhanova & Kopp, 2009), sendo esta codificada pelo gene SLC26A4 que está localizado no cromossoma 7q21-31 (Bizhanova & Kopp, 2009). A pendrina possui 11 ou 12 domínios transmembranas com as extremidades amino e carboxiterminal voltadas para o citosol (Gillam et al., 2004; Royaux et al., 2000).

Sobre a importância da pendrina para o transporte de iodeto para o lúmen folicular, Bizhanova & Kopp, (2009) relatam que os resultados obtidos a partir de um número de estudos independentes realizados em sistemas heterólogos suportam o papel da pendrina na mediação, pelo menos em parte, do efluxo apical de iodeto, levando a condição de hipotireoidismo quando o seu funcionamento é alterado e/ou modificado. Em contrapartida, alguns estudos têm levado a questionar o papel da pendrina no transporte de iodeto na membrana apical das células foliculares (Bizhanova & Kopp, 2011). O fato de que alguns indivíduos com mutações bialélicas no gene SLC26A4 (*Solute Carrier 26A4*), que codifica a pendrina, não apresentarem ou apresentarem

apenas fenótipo leve e tardio de hipotireoidismo (Park et al., 2003; Reardon et al., 1997; Sato et al., 2001; Tsukamoto et al., 2003), indica que o iodeto pode atravessar a membrana apical independentemente da pendrina através de outro canal ou canais de iodeto inespecíficos (Bizhanova & Kopp, 2011). Foi evidenciado que camundongos *knockout* para o gene SLC26A4 não apresentaram disfunção tireoideana (bócio e níveis alterados de HT) (Everett et al., 2001) questionando a importância da pendrina no transporte de iodeto, pelo menos em ratos.

Outras proteínas [SLC5A8 e canal de cloreto 5(CLC-5)] têm sido propostas para mediar o efluxo de iodeto apical (Rodriguez et al., 2002; van den Hove et al., 2006). Estudos funcionais demonstram claramente que SLC5A8, originalmente designado como transportador humano apical iodeto (hAIT) (Rodriguez et al., 2002), não media a captação ou efluxo de iodeto (Paroder et al., 2006). A localização da proteína CLC-5 na membrana apical do tireócitos e a presença de bócio (mesmo com status eutireoideo) e atraso na organificação do iodo em camundongos com deficiência em CLC-5, sugere que CLC-5 poderia ser, possivelmente em conjunto com outros canais de cloreto, envolvida na mediação de efluxo iodeto apical ou troca de iodeto/cloreto (van den Hove et al., 2006).

A Síndrome da Pendrina constitui uma desordem autossômica recessiva causada por uma mutação no gene SLC26A4, que codifica a pendrina (Fu et al., 2016). A Síndrome da Pendrina se caracteriza pela alteração funcional da glândula tireoide devido a uma dishormonogênese da tireoide, perda auditiva sensorio-neural e má formação do ouvido interno (Huang et al., 2013; Park et al., 2014). Em aproximadamente 30% dos pacientes a dishormonogênese esta resente no nascimento e é diagnosticada no *screening* neonatal para hipotireoidismo congênito. É causada por mutações heterozigóticas ou homozigóticas no gene SLC26A4 que codifica pendrina que é altamente expressa na tireoide, no ouvido interno e nos rins (Chen et al., 2013; Sagong et al., 2012). O estudo mais recente realizado com pacientes que apresentavam Síndrome da Pendrina que é uma evidenciou que a ausência da pendrina é acompanhada por um aumento na imunomarcacao e expressão de CLC-5 que podem transitoriamente compensar o efluxo apical de iodeto (Senou et al., 2010).

È sugerido que o TSH também ativa o mecanismo de transporte de iodeto apesar da expressão da pendrina não ser regulada por este hormônio. Assim, já na luz folicular, o iodeto sofre oxidação pela tireoperoxidase (TPO). A TPO é uma selenoproteína (Stathatos, 2012), ancorada, via o domínio transmembrana C-terminal (Grasberger, 2010), a membrana apical do folículo cuja face catalítica está voltada para o lúmen folicular. Este processo tem como co-substrato o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como doador de O_2 , gerado por duas glicoproteínas homólogas, dual-oxidase 1 e 2 (DUOX 1 e 2) (De Deken et al., 2000; Morand et al., 2003; Moreno et al., 2002), originalmente chamadas de *thyroid oxidases* ou THOX (Grasberger, 2010). DUOX é localizada na membrana apical da tireóide e apresenta a porção C terminal de sua proteína com atividade nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato (NADPH) oxidase (sítio de ligação para a co-enzima NADPH) e sítio de ligação para a co-enzima dinucleotideo de flavina e adenina (FAD) (Carvalho & Dupuy, 2013; Donkó et al., 2005; Mihai, 2011; Moreno et al., 2002).

A porção C-terminal da DUOX converte o NADPH citoplasmático em $NADP^+$, pela liberação de dois elétrons e um próton (Rada & Leto, 2008). O próton permanece no citoplasma, enquanto que os dois elétrons são transportados primeiro para o FAD, depois para os dois grupos hemes, sequencialmente, e finalmente se ligam-se a molécula de oxigênio (promove redução do O_2) resultando na formação de dois ânions superóxidos no espaço extracelular (Rada & Leto, 2008).

Além da porção com atividade NADPH oxidase, a DUOX também apresenta um domínio N-terminal homólogo as peroxidases (Donkó et al., 2005) (figura 7). Entre a porção N-terminal e o domínio com atividade NADPH oxidase existem dois *EF-hand motifs* (na alça do primeiro domínio transmembrana), sugerindo que os íons de cálcio regulam a sua atividade (Donkó et al., 2005). *EF-hand motifs* consistem em duas alfa hélices ligadas, onde se ligam íons de cálcio (Lewit-Bentley & Réty, 2000) (figura 8). A ligação do cálcio ao *EF-hand motifs* induz mudanças estruturais (expõe uma superfície hidrofóbica da proteína) o que ativa a proteína (Lewit-Bentley & Réty, 2000).

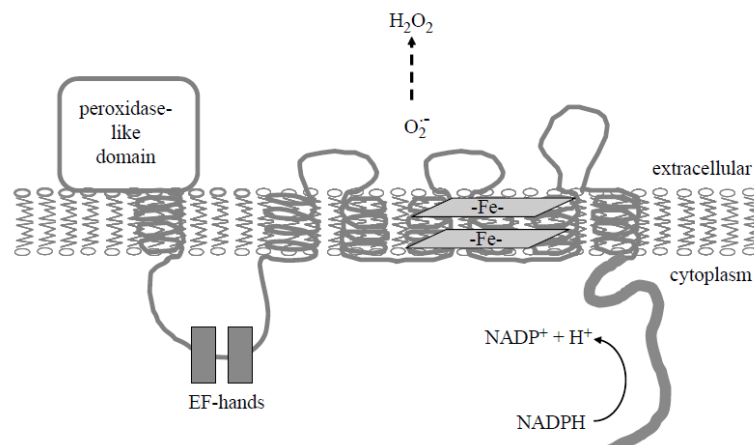


Figura 7. Estrutura dos domínios das DUOXs. (Donkó et al., 2005)



Figura 8. Representação simbólica do EF-hand motif. A hélice E está representada pelo indicador e a hélice F pelo polegar. Quando o íon de cálcio se liga ao complexo, a hélice F se move da sua conformação fechada (apoproteína em cinza claro) para a aberta (apoproteína em cinza escuro). Modificado de Lewit-Bentley & Réty, 2000.

DUOX pertence a família das NADPH oxidases (NOX) e esta família é composta por 7 membros, cinco NOXes (NOX1-5) com seis domínios transmembranas e duas DUOXs (DUOX 1 e DUOX 2) com sete domínios transmembranas todas contendo duas regiões de ligação heme (Carvalho & Dupuy, 2013; Krause, 2004; Lambeth, 2004). NOXes e DUOXs, diferem entre si pela presença de um domínio extracelular semelhante a peroxidase (figura 9) (Carvalho & Dupuy, 2013).

Os genes da proteína DUOX1 e 2 são co-expressos com os genes dos seus fatores de maturação DOUXA 1 e 2, respectivamente, pelo cromossomo 15 (Grasberger &

Refetoff, 2006). Sendo que já foi demonstrado que a co-expressão de DUOXA2 permite a transição do retículo endoplasmático para o complexo de golgi, maturação e translocação da DOUX para a membrana plasmática (Grasberger & Refetoff, 2006).

Na década passada, as primeiras mutações na DUOX2 (homozigotas ou heterozigotas) foram identificadas em pacientes com alteração na organificação de iodo resultando em hipotireoidismo congênito (Moreno et al., 2002; Pfarr et al., 2006). E nos anos subsequentes mais estudos, clínicos e experimentais, foram realizados demonstrando a presença de hipotireodismo congênito permanente ou transitório nas mutações na DUOX2 e no seu fator de maturação (Grasberger et al., 2007; Hular et al., 2011).

Até o momento, nenhuma mutação na DUOX1/DUOXA1 em humanos foi relacionada a alterações nas concentrações de hormônios tireoideanos (Carvalho & Dupuy, 2013; Grasberger, 2010), o que sugere que DUOX2 / DUOXA2 é a fonte primária de suporte de H_2O_2 para formação dos hormônios tireóideanos (Dupuy et al., 1999). Esta hipótese é reforçada pelo fato de que camundongos knockout para DUOX1 não apresentarem o fenótipo de hipotireoidismo congênito (Donkó et al., 2010).

Assim, o papel exato da DUOX1 na tireóide permanece desconhecido. No entanto, devido ao fato de algumas mutações na DUOX2 e DUOXA2 levarem a um quadro temporário de hipotireoidismo, acredita-se que a DUOX1 poderia suprir a falta de atividade da DUOX2 , pelo menos em algumas circunstâncias (Carvalho & Dupuy, 2013).

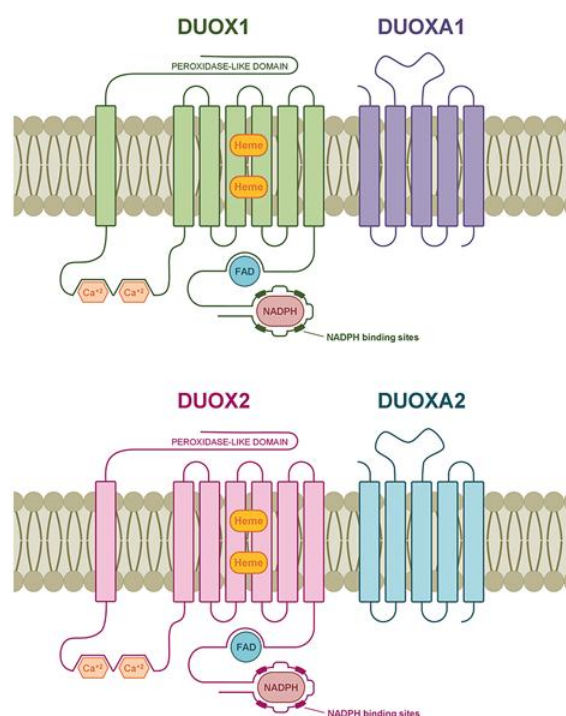


Figura 9. Representação esquemática da DUOX1 E DUOX2 e de seus ativadores DUOXA1 e DOXA2 (Carvalho & Dupuy, 2013).

É importante salientar que tanto a geração de peróxido de hidrogênio quanto a atividade NADPH-oxidase dependente de cálcio é dependente da presença de tireotrofina (TSH) (Carvalho & Dupuy, 2013). A estimulação deste fenômeno pelo TSH depende da ativação da cascata de sinalização da proteína Gq (o receptor TSHR é acoplado a proteína Gq). Isto leva ao aumento intracelular de cálcio (via PLC-/IP3) e ativação da PKC (via PLC-/diacilglicerol). Cálcio e PKC agem sinergicamente na ativação do complexo enzimático DUOX2/ DUOXA2 (Grasberger, 2010) o que leva a produção de peróxido de hidrogênio, o que promove a iodação da tirosina.

Assim, para a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), é necessário a formação e ativação de um complexo enzimático DUOX2/ DUOXA2 na membrana plasmática (Donkó et al., 2014). No entanto até o momento não está muito claro como a DUOX produz H_2O_2 . Segundo (Massart et al., 2011), o domínio extracelular desta glicoproteína, com atividade semelhante a peroxidase, poderia desempenhar um papel dismutase.

Uma vez oxidado, o iodo é então incorporado às moléculas de tirosina, por ligação covalente (Grasberger, 2010), que estão unidas por ligações peptídicas à proteína TG. Esta glicoproteína serve de “molde” para a biossíntese dos hormônios tireoidianos. Esta reação é denominada organificação (Bizhanova & Kopp, 2009; Mihai, 2011) e é catalizada pela TPO na presença de peróxido de hidrogênio (Bizhanova and Kopp, 2009). A iodinação especificamente dos aminoácidos tirosina da TG, resulta na formação das moniodotirosinas (MITs) e diiodotirosinas (DITs). As MITs e DITs se acoplam no interior do colóide folicular para a formação das iodotironinas (figura 10) (T3 e T4).

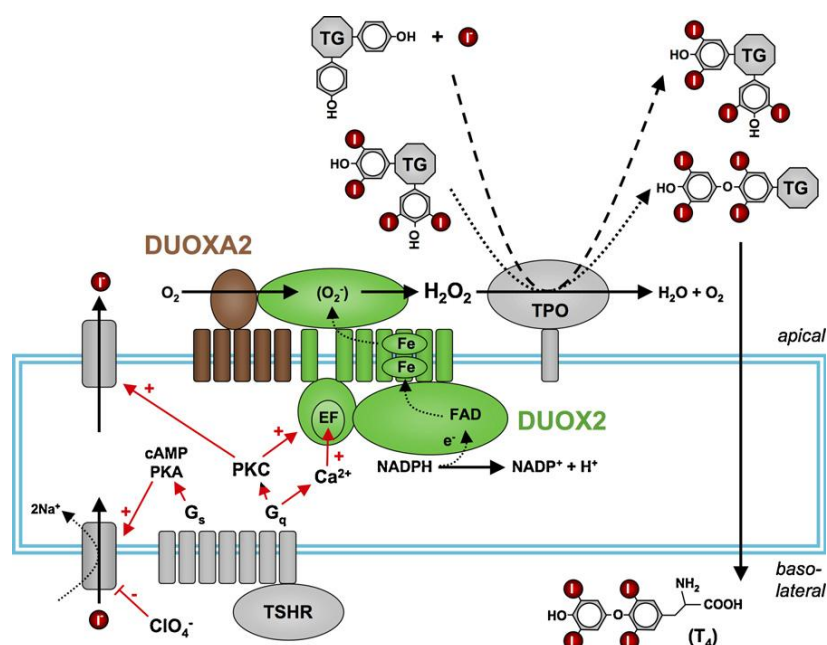


Figura 10. Síntese de hormônios tireoideanos (Grasberger, 2010).

Assim, após a iodinação da tireoglobulina, esta é estocada no lúmen do folículo tireoideano como coloide. Para a liberação de T3 e T4 para a corrente sanguínea, é necessária a ligação da tireoglobulina ao receptor megalina (Marinò et al., 2000; Zheng et al., 1998), que é um receptor endocítico, da família dos receptores das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Saito et al., 1994; Willnow et al., 1999), com alta afinidade para TG (Marinò et al., 2000), que promove a transcitose da TG iodada (Christensen & Birn, 2002) para em seguida esta sofrer degradação lisossomal (Marinò & McCluskey, 2000). O receptor de megalina possui um único domínio transmembrana e

apresenta um domínio amino-terminal (extra-celular) grande e um domínio C-terminal pequeno (figura 11) (Christensen & Birn, 2002).

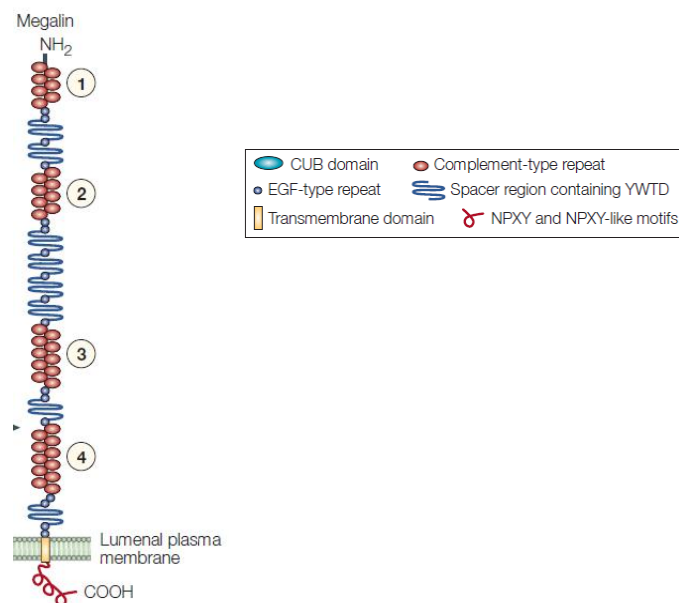


Figure 11. Estrutura da megalina (Modificado de (Christensen & Birn, 2002)).

O TSH que contribuiu na formação de T3 e T4 e participa também da secreção destes hormônios. Sob ação do TSH, ocorre aumento do número e da motilidade das microvilosidades da membrana apical da célula folicular tireoidiana, que endocitam o colóide intrafolicular. Assim, o interior da célula folicular passa a possuir vesículas contendo colóide.

O TSH estimula a migração de lisossomos em direção a estas vesículas e estes se fundem as mesmas formando os fagolisossomos. Proteases presentes nestes lisossomos hidrolisam a TG presente no colóide destas vesículas, promovendo assim a liberação de T3, T4, MITs e DITs para o citoplasma da célula folicular, bem como de T3 e T4 para a circulação (Aires M, 2008). Parte do T4 presente no citoplasma sofre desiodação em T3 (Aires M, 2008).

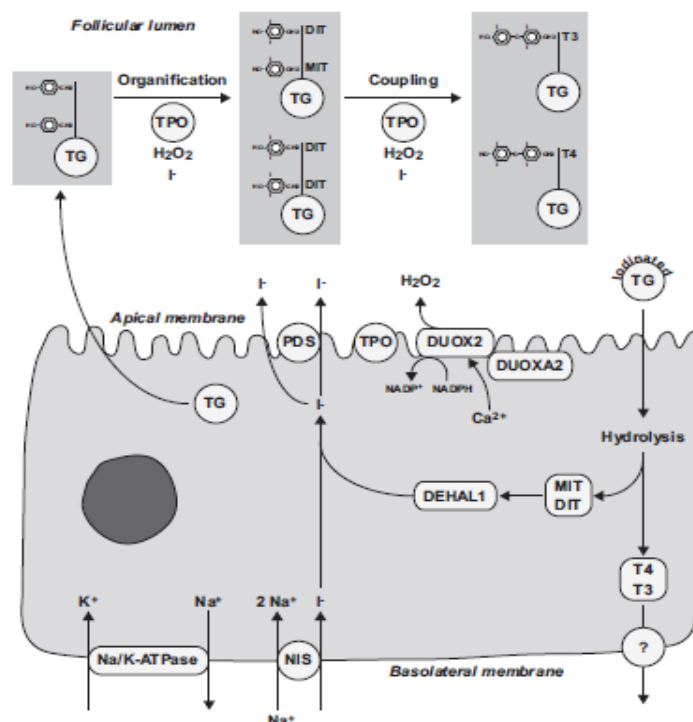


Figura 12. Representação esquemática da síntese de hormônios tireoideanos (Bizhanova & Kopp, 2009).

As moléculas de MIT e DIT que também foram liberadas no citoplasma do tireócito, após hidrólise da TG, são desiodadas na célula folicular pela dehalogenase tirosina (DEHAL) (Aires M, 2008). A enzima DEHAL, presente na célula folicular remove o iodo de MIT e DIT, mas não promove a deiodação de T4, T3 e rT3 (Aires M, 2008). Este iodeto é então reciclado para nova síntese de T3 e T4 (Gnidehou et al., 2004). É importante ressaltar que apenas pequenas quantidades da tireoglobulina intacta deixam a célula folicular, sob circunstâncias normais. O T3 e o T4, até onde se sabe, deixam o tireócito pela membrana basal por difusão simples (figura 12) (Aires M, 2008).

2.1.4. Transporte dos HTs na corrente sanguínea

Uma vez na corrente sanguínea, os HTs circulam, quase que em sua totalidade, ligados a proteínas plasmáticas específicas. 75% destes circulam ligados a globulina ligadora da tiroxina (TBG, *thyroxine-binding globulin*), 15% a pre-albumina ligadora de tireoide (TBPA, *thyroid-binding pre-albumin*) ou transtirretina (TTP) e 10% a albumina (Mihai, 2011). Além destas proteínas transportadoras é possível se observar na literatura

a importância, apesar de pequena, das apolipoproteínas das subclasses A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III e E. Com reconhecida afinidade da apolipoproteína A-1 por T4 (Aires M, 2008). Apenas 0,02% do T4 e 0,4% de T3 circulam livres na corrente sanguínea (Mihai, 2011). Somente o hormônio livre entrará na célula para exercer ação fisiológica. O HT ligado as proteínas transportadoras é um reservatório de T3 e T4 liberado pela tireoide, e disponibiliza apenas uma pequena fração na forma livre de HT para a célula (Aires M, 2008).

TBG, a principal proteína ligadora de HTs, é sintetizada no fígado e se liga a uma única molécula de T3 ou de T4. A síntese de TBG é regulada por estrógeno e por isso os níveis desta proteína se elevam durante a gravidez. Por outro lado, andrógenos inibem a síntese de TBG. Em contraste, TTP é a principal proteína transportadora do fluido cerebro-espinhal, uma vez que esta é produzida pelas células epiteliais do plexo coroide e secretada no líquido o qual não contém as proteínas ligadoras de HTs, TBG e albumina (Wirth et al., 2014).

Embora a concentração total de T4 ultrapassa a de T3 por duas ordens de magnitude, T4 é fortemente ligado a proteínas transportadoras, e as concentrações livres de T4 e T3 são bastante semelhantes (Bianco & Kim, 2006a; Verloop et al., 2014).

2.1.5. Geração periférica de T3 a partir de T4

Como dito anteriormente a glândula tireoide sintetiza e secreta em maior quantidade o T4, que não é a forma biologicamente ativa dos HTs. Assim, em indivíduos eutireóides, a conversão periférica de T4 em T3 é responsável por 80% de todo o T3 circulante. Este passo é crítico no metabolismo dos hormônios tireoidianos e é catalisado pelas desidases, enzimas da família das selenoproteínas, que estão envolvidas na homeostase local e periférica dos hormônios da tireoide (Verloop et al., 2014). Até o presente momento, três desidases (D1, D2 e D3), já foram descritas (codificadas por *dio1*, *dio2* e *dio3* respectivamente) (figura 13). A desidase tipo 1 (D1) e desidase tipo 2 (D2) desempenham um papel importante na conversão de T4 em T3 (via deiodação do anel externo (5') do T4) (Darras & Van Herck, 2012). Embora ambas as desidases sejam determinantes nos níveis de hormônios da tireoide periférica, D2 é particularmente conhecida por seu papel na produção de T3 local (Bianco et al., 2002;

Maia et al., 2011a, 2005a). D1 e D2 são enzimas integrais de membrana, sendo que D1 localiza-se na membrana plasmática celular (com seu domínio catalítico voltado para o citosol) (Baqui et al., 2000; Toyoda et al., 1995) e D2 especificamente na membrana do retículo endoplasmático (com seu domínio catalítico voltado para o citosol) (Baqui et al., 2000).

D1 é uma enzima multifuncional, com meia vida maior do que 12 horas (Gereben et al., 2000), que pode clivar tanto o anel interno quanto o externo de uma iodotironina (Darras et al., 2015), este processo resulta, respectivamente, em inativação e ativação dos hormônios tireoideanos (Schneider et al., 2006). Sendo que o substrato preferido de D1 é o T3 reverso (rT3) (Darras et al., 2015) e estudos em camundongos com deficiência (KO) em D1 sugerem que a principal função de D1 é como enzima de limpeza, importantes na reciclagem de iodo e de iodotironinas inativas e menores (Maia et al., 2011a; Schneider et al., 2006).

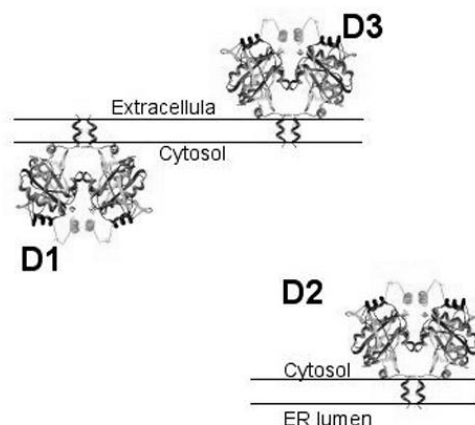


Figura 13. Representação esquemática de D1, D2 e D3 (Bianco, 2004).

A desiodase do tipo 3 (D3) possui meia vida maior do que 12 horas (Gereben et al., 2000) e é a principal enzima de inativação do T3, convertendo T3 para T2 e T4 e T4 para rT3, por meio da deiodação do anel interno destes hormônios (Aires M, 2008; Arrojo E Drigo et al., 2013a, 2013b; Bianco et al., 2002; Köhrle, 1999; Maia et al., 2011b). D3 está presente na membrana plasmática celular e na membrana nuclear (Baqui et al., 2003; Jo et al., 2012). e isto depende da disponibilidade de oxigênio (Jo et

al., 2012). Jo et al., (2012) revelaram um tráfego intracelular do D3 que é regulada pela disponibilidade de O_2 . Após a D3 ser sintetizada no retículo endoplasmático esta pode ser direcionada para a membrana plasmática, em condições de normóxia, ou para o núcleo em condições de hipóxia. Isto ocorre devido ao fato da D3 nuclear manter atividade catalítica e ser fisicamente mais próxima dos receptores para hormônios tireoideanos (TRs), o que promove profundo esgotamento do T3 diminuindo rapidamente o metabolismo (Jo et al., 2012), o que é importante em condições de baixo aporte de oxigênio para o corpo (figura 14).

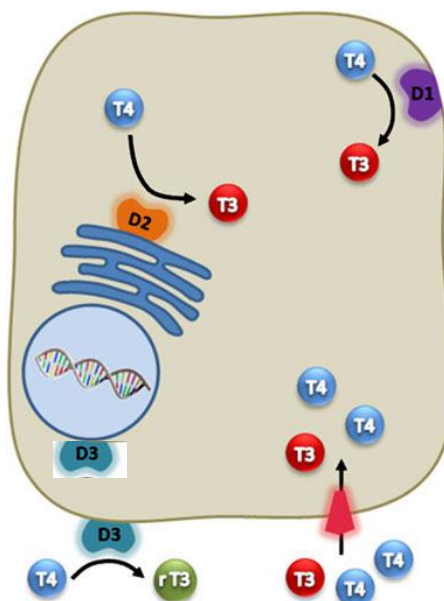


Figura 14. Representação esquemática da localização de D1, D2 e D3 (modificado de Araujo & Carvalho, 2011).

As desidases tem um padrão de expressão que é tecido-específica (Bianco et al., 2002; Köhrle, 1999). A D1 é expressa principalmente no fígado, rim, tireoide e hipófise (Köhrle, 1999). A expressão de D1 no cérebro permanece controversa (Wirth et al., 2014). A D2 é detectado no sistema nervoso central (SNC), pituitária, músculo esquelético, tireoide, coração, osso e tecido adiposo marrom (Bianco et al., 2002). D3 está localizada no SNC e na placenta e é predominantemente expressa em muitos tecidos durante a vida fetal (Bianco et al., 2002; Köhrle, 1999). No SNC, D2 é expresso nas células da glia, principalmente em astrócitos e tanícitos, enquanto que D3 é principalmente encontrada nos neurônios (Wirth et al., 2014) (vide figura 18).

Em geral, um tipo de célula expressa apenas um tipo de desidase em um determinado momento, embora alguns tecidos possam não expressar nenhuma delas, e

todos os três tipos de desidases possam ser encontradas na glândula pituitária (Bianco & Kim, 2006a). Estas selenioproteínas constituem um sistema homeostático que controla a concentração intracelular de hormônio da tireóide ativo dentro de tecidos humanos (Gereben et al., 2000).

É sabido que durante o desenvolvimento fetal, altas concentrações de D3 na placenta, no útero e no tecido fetal protege os órgãos em desenvolvimento da exposição excessiva a T3 e facilita a proliferação celular (Wasco et al., 2003). No nascimento, as concentrações de D3 declinam rapidamente enquanto a expressão de D2 aumenta sendo isto fator importante para a diferenciação celular e maturação dos tecidos durante o desenvolvimento pós-natal (Bianco & Kim, 2006b; Gereben et al., 2008; St Germain et al., 2009).

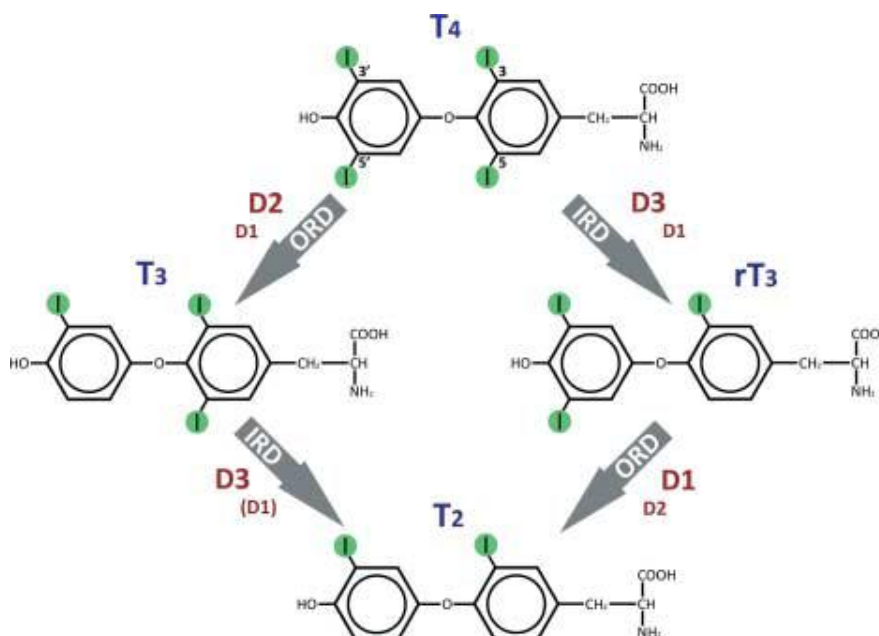


Figura 15. Reações básicas de desiodação (Darras & Van Herck, 2012).

Uma vez dentro da célula alvo, T4 pode ser ativado através de conversão para T3 pela via de D2 (por exemplo), de tal modo que o conteúdo citoplasmático de T3 depende do T3 vindo do plasma e da conversão de T3 intracelular (Bianco & Kim, 2006a). Assim, as desidases são determinantes críticos do conteúdo de T3 citoplasmático e, por conseguinte, modulam a concentração de T3 nuclear e a saturação dos receptores nucleares deste hormônio (Bianco & Kim, 2006a). Em ratos normais, a D2 é responsável por cerca da metade do conteúdo T3 nuclear no cérebro, glândula

pituitária e no tecido adiposo marrom (Bianco & Kim, 2006a). É sabido até o presente momento, que todas as três desidases formam homodímeros e que esta homodimerização é necessária para a sua atividade catalítica (Sagar et al., 2008).

A D2 apresenta alta afinidade por T4, quando comparada a D1 (Aires M, 2008). Assim, acredita-se que a via de D2, em vez de a via de D1, é a maior fonte de produção de T3 extratiroideia em seres humanos com base em vários estudos clínicos prévios (Geffner et al., 1975; Maia et al., 2005b; Saberli et al., 1975). Em contraste, a atividade D1 é aumentada em pacientes com hipertireoidismo, de modo que esta via se torna a fonte extratiroideia da concentração de T3 (Abuid & Larsen, 1974). Essa predominância de D1, nesta patologia, pode ser constatada pela rápida queda nas concentrações séricas de T3, quando pacientes com hipertireoidismo são tratados com propiltiouracil (PTU), uma droga que inibe seletivamente a produção de T3 via D1 (Bianco & Kim, 2006a).

D2 é considerada crítica para a homeostase de T3 na periferia, devido a sua plasticidade (Bianco, 2004). Por exemplo, a resposta de D2 ao monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) gerado a partir da ativação da cascata de sinalização dos receptores noradrenérgicos acoplados a proteína Gs, constitui a base para a estimulação adrenérgica desta enzima no tecido adiposo marrom (BAT), músculo esquelético humano e tireoide, ligando a expressão de D2 com o sistema nervoso simpático e ampliando o espectro dos estímulos ambientais e endógenos que podem potencialmente influenciar a produção adaptativa de T3 (Bianco, 2004; Bianco et al., 2002).

Devido à sua plasticidade fisiológica D2, e não D1 é considerada a desidase homeostática fundamental durante a adaptação à deficiência de iodo, a exposição ao frio, ou mudanças no estado da tireoide (Bianco et al., 2002). Em contraste com D1, D2 tem uma relativamente baixa Km (constante de Michaelis-Menten, T4) e uma meia-vida curta, permitindo-lhe responder dentro de minutos a estímulos neurais e endócrinos (Bianco et al., 2002). (Bianco & Kim, 2006a), relatam que o tempo de meia vida da D2 é de aproximadamente 20 minutos e (Dentice et al., 2005a) descreve este tempo como variável entre 12 e 300 minutos, a depender da taxa de desidatação de T4.

D2 possui um único domínio transmembrana e a maior parte da enzima está no citosol, incluindo a selênio-cisteína contendo o centro ativo catalítico (Baqui et al., 2000, p. 200). A sua meia vida curta é devido a ubiquitinação e a proteólise por

proteossomas, um mecanismo que é acelerado pela interação da D2 com T4, que converte este pró-hormônio a sua forma ativa, T3 (Botero et al., 2002). A D2 possui uma meia-vida curta, como descrita anteriormente, que pode ser ainda mais reduzida por exposição a concentrações fisiológicas do seu substrato, o T4, e em situações experimentais pelas concentrações de T3 reverso ou T3 (Bianco, 2004). Este constitui um potente ciclo de feedback rápido, que controla a produção de forma eficiente T3 e T3 intracelular com base em quanto T4 está disponível (Bianco, 2004).

Um mecanismo regulatório importante para que haja homeostase de T3, é a ligação covalente de D2 a proteína ubiquitina. Ubiquitinação é um evento reversível, cíclico (Arrojo E Drigo & Bianco, 2011), multi-enzimático e de multi-passo, que resulta na conjugação da molécula de ubiquitina em uma proteína alvo (Arrojo E Drigo et al., 2013b). Proteínas ubiquitinadas são consequentemente reconhecidas e degradadas por proteossomos. A ubiquitinação e a degradação proteossomal da D2 estão profundamente implicadas na regulação pós-transcricional da atividade desta enzima (Bianco, 2004). A deiodação de T4 por D2 resulta em exposição dos resíduos de lisina desta enzima e a ubiquitinação destes resíduos reduz a atividade de D2 (Bianco, 2011; Sagar et al., 2008).

Várias proteínas envolvidas no processo de ubiquitinação D2 foram identificadas (Arrojo E Drigo et al., 2013b). Incluindo as evolutivamente conservadas ubiquitina ligase E2 6 e 7 (UBC6 e 7) (Botero et al., 2002), que interagem com a ubiquitina ligase E3 (a WSB-1 é parte da E3 ubiquitina ligase e é uma SOCS-box-containing WD-40 protein) e com outras proteínas acessórias para formar um complexo denominado BC-Elongin Cullin5-RBX1 (ECSWSB-1) para ubiquitinar D2 (Dentice et al., 2005a; Sagar et al., 2007). Tal como outras proteínas ubiquitinadas, D2 pode ser degradada em grandes complexos de protease conhecidos como proteossomas. A ubiquitinação da D2 ocorre do lado citosólico da membrana do retículo e a degradação proteossomal no citoplasma (Arrojo E Drigo et al., 2013a). As proteínas residentes no retículo, como D2, são "puxadas para fora" da membrana através retrotranslocação e entregues ao proteossoma (figura 16) (Arrojo E Drigo et al., 2013a).

A ubiquitinação é uma reação reversível, na qual uma molécula de ubiquitina pode ser removida pela ação de enzimas desubiquitinadoras (Arrojo E Drigo et al.,

2013b). As *ubiquitin-specific proteases* (USPs), especificamente as USP33 e USP20 (também conhecidas, respectivamente como von Hippel-Lindau deubiquitinating 1 e 2 - VDU-1 e VDU-2), estão envolvidas neste processo e interagem com D2 (Curcio-Morelli et al., 2003).

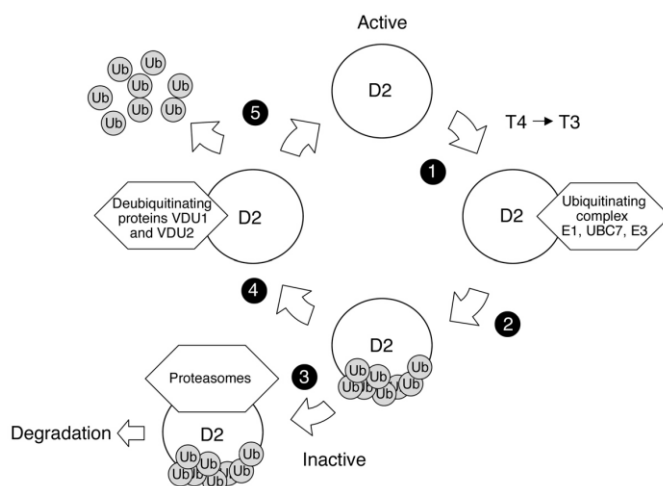


Figura 16. Ubiquitinação e desubiquitinação da D2 (Curcio-Morelli et al., 2003).

É importante salientar que não existe nenhuma evidência de ubiquitinação nas desidases tipo 1 e tipo 3, até o momento (Gereben et al., 2000).

2.1.6. Transportadores de membrana

Muitas das ações dos HTs ocorrem através da ligação destes hormônios a transportadores de membrana no tecido alvo. Dada às propriedades lipófilas dos HTs, durante 25 anos (até 1970) se pensou que os HTs difundiam-se passivamente através da bicamada lipídica da membrana plasmática (Hennemann et al., 2001). No entanto, atualmente sabe-se que a entrada de hormônios tireoideanos na célula-alvo é facilitada por vários transportadores pertencentes ao grupo das proteínas transportadoras de solutos (SLC), que inclui os transportadores de monocarboxilato (MCT), a família dos polipeptídios transportadores de ânions orgânicos (OATP) (Muzzio et al., 2014; Stathatos, 2012) e os transportadores de aminoácidos tipo L (LAT1 e LAT2)

A maioria dos membros da família MCT são transportadores de órfãos (MCT5 , MCT7 , MCT9 , MCT11-14) , enquanto que o transporte MCT1-4 transportam monocarboxilatos simples, como lactato e piruvato (Halestrap & Meredith, 2004). MCT6 está envolvida no transporte de compostos com um grupo carboxilo , tais como diuréticos bumetanida e nateglinida (Murakami et al., 2005). Da família dos transportadores MCT, evidências atuais sugerem que apenas MCT8 e MCT10 parecem funcionar no transporte de HTs (Halestrap & Meredith, 2004; Visser et al., 2011). MCT10 era conhecido como transportador de aminoácido tipo-T 1 (TAT1) e devido a sua homologia com os transportadores da família MCT, foi denominado MCT10 (Visser et al., 2011).

As proteínas MCT8 (SLC16A2) de humano e de rato apresentam uma especificidade elevada para HTs e transportam T4 , T3 , rT3 , e T2 para o citoplasma da célula alvo (Friesema et al., 2003; Visser et al., 2008; Visser & Visser, 2012). MCT10 humano transporta tanto T3 quanto T4 e apresenta uma maior afinidade para o T3 (Friesema et al., 2008; Visser & Visser, 2012). MCT8 e MCT10 estão envolvidos no influxo e efluxo celular de HTs (Visser et al., 2008)..

MCT8 e MCT10 possuem 12 domínios transmembranares com as porções carboxi e amino-terminais voltadas para o citosol (van der Deure et al., 2010; Visser et al., 2011). MCT8 e MCT10 são proteínas com estrutura e propriedades altamente homólogas (vide figura 17). Esta homologia é maior nos domínios transmembranas e menor nas porções carboxi e amino-terminais (van der Deure et al., 2010).

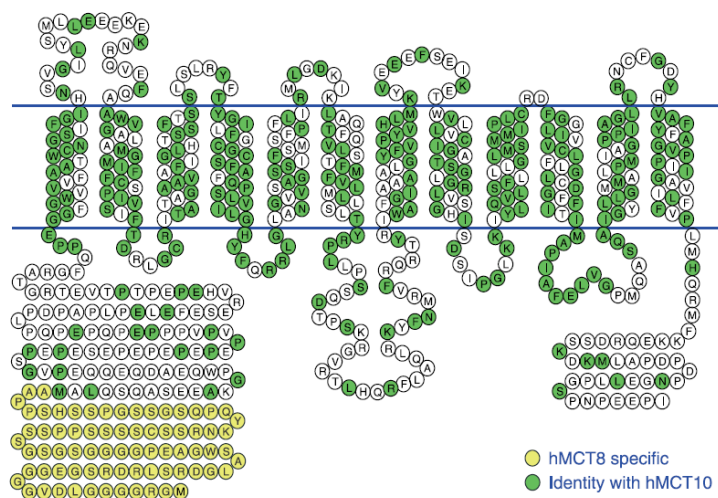


Figura 17. Estrutura do MCT8 e MCT10 (van der Deure et al., 2010).

MCT8 mostra uma distribuição tecidual ampla em todas as espécies estudadas. Em ratos, a proteína MCT8 tem sido detectada no coração e no cérebro destes animais (Friesema et al., 2003; Kogai et al., 2010). Além disso, mais recentemente foi demonstrado que MCT8 encontra-se colocalizada com a proteína NIS na membrana basolateral de tireócitos de ratos (Ishido et al., 2015). Nos seres humanos, MCT8 é encontrada em diversos tecidos, em particular no fígado e coração (Price et al., 1998). Estudos em tecidos cerebrais de camundongos e humanos revelaram a expressão de MCT8 em distintas populações neuronais, com altas concentrações de RNAm para este transportador no córtex cerebral, hipocampo, amígdala, bem como no núcleo paraventricular (Mayerl et al., 2014). Além disso, podemos encontrar a proteína MCT8 na eminência mediana e em neurônios do núcleo paraventricular, supraóptico e núcleo infundibular do hipotálamo, além de células gliais ependimais que revestem internamente o terceiro ventrículo (Alkemade et al., 2005).

Dados de Chan et al., (2006) demonstram que a expressão do RNAm e da proteína MCT8 na placenta humana encontra-se aumentada durante a gestação. Estes achados corroboram os de (Loubière., (2010) que identificaram em placentas humanas RNAm para MCT8 desde o começo do primeiro trimestre e aumento significativo deste, com o avançar da gestação. Para MCT10 foi evidenciado uma tendência de aumento ($p=0,065$) (Loubière et al., 2010).

Neste contexto, a Síndrome Allan -Herndon – Dudley (AHDS), descoberta em 1944, consiste em uma doença genética ligada ao cromossomo X que se apresenta como forma grave de retardo psicomotor, hipotonia, fraqueza e redução da massa muscular associado a um quadro elevado T3 sérico e baixo ou normal T4 e rT3 sérico e TSH ligeiramente elevado ou normal e tem como base genética mutações no gene SLC16A2 que codifica o MCT8 (Heuer & Visser, 2013; Mayerl et al., 2014; Visser & Visser, 2012). A patogenese da doença não está completamente compreendida, mas acredita-se que exista uma condição de aporte insuficiente de HTs para o cérebro (hipotireoidismo cerebral) nestes indivíduos. Este conceito é baseado no fato de existir MCT8 nas células dos capilares endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE) e na barreira fluido cerebrospinal-sangue (BFCS) (especificamente no plexo coroide), nos tanicitos (células ependimais periventriculares) e em células neuronais (Alkemade et al., 2005; Heuer et al., 2005; Lori M. Roberts et al., 2008; Wirth et al., 2014).

Os animais *knockout* (KO) para MCT8 replicam fielmente as anormalidades nas concentrações séricas de HTs (Trajkovic-Arsic et al., 2010). No entanto, diferentemente dos pacientes com a síndrome AHDS os camundongos MCT8 KO não exibem sintomas neurológicos evidentes. Estudos *in vivo* revelaram diminuída captação de T3 no cérebro dos camundongos MCT8 KO (Ceballos et al., 2009a; Trajkovic et al., 2007). No entanto, o transporte de T4 para o SNC foi apenas parcialmente comprometido nestes animais. Desta forma, os camundongos KO MCT8 exibiram apenas uma redução moderada no conteúdo T3 cérebro, uma vez que ocorreu aumento da atividade da desidrase tipo 2 nos astrócitos e, promovendo elevação da conversão local de T4 a T3 (Trajkovic et al., 2007). Os achados de Ceballos et al., (2009b) sugerem uma restrição para a entrada de T3, via BHE, nas células neuronais de camundongos MCT8 KO e não de T4.

Assim, parece que os ratos expressam outro transportador específico que mantém a passagem de T4 quase normal através da BHE e da BFCES na ausência de MCT8, o que justificaria o fato do cérebro do camundongo deficiente de MCT8 ser muito menos afetado pela deficiência deste transportador que o SNC dos seres humanos (Mayerl et al., 2014). Segundo Mayerl et al., (2014) os polipéptidos transportadores de ânions orgânicos 1c1 (OATPC1C), também chamado de OATP14 ou OATP-F, poderiam substituir o transporte de T4 pelo MCT8 para o cérebro. Em ratos a expressão de OATPC1C no cérebro é restrita e ocorre principalmente na BHE e na BFCES (Sugiyama et al., 2003; Tohyama et al., 2004).

O polipeptídeo transportador de ânions orgânicos 1C1 (OATP1C1, *organic anion transporting polypeptide1C1*, também conhecido como Slco1c1 e Oatp14) de mamíferos tem uma maior afinidade para T4 e rT3 do que para outro HT (Van Herck et al., 2013; Visser et al., 2011). Assim, células que expressam OATP1C1 mostram transporte preferencial de T4 e rT3 (Pizzagalli et al., 2002; Sugiyama et al., 2003; Tohyama et al., 2004; Van Herck et al., 2013). Outros Oatps de mamíferos incluindo Oatp2b1, Oatp3a1, e Oatp4a1 também transportam T4 e, em alguns casos, T3 ou rT3, embora muitas vezes com uma afinidade mais baixa (Fujiwara et al., 2001; Huber et al., 2007; van der Deure et al., 2010; Visser et al., 2011). OATP1C1 está amplamente distribuído no cérebro humano (van der Deure et al., 2010). Oatp1c1, como dito anteriormente, é expresso principalmente na barreira hematoencefálica e na barreira

fluido cerebrospinal-sangue, especificamente e respectivamente nos capilares cerebrais e no plexo coroide e por isso parece ser essencial para a entrega de hormônio tireoidianos essenciais para o desenvolvimento do cérebro (Tohyama et al., 2004).

Estudos sugerem um papel importante para o transporte de T4 em OATP1C1 através da BHE, principalmente em roedores (Pizzagalli et al., 2002; Sugiyama et al., 2003; Tohyama et al., 2004).. Assim, para avaliar a importância da expressão de OATP1C1 na BHE e na BFCES no SNC, (Mayerl et al., 2012) desenvolveram camundongos OATP1C1 *KO* e observaram que a ninhada se desenvolveu de forma semelhante ao controle, com concentrações séricas de HTs sem diferença do controle, bem como na ação periférica dos HTs. No entanto, no cérebro dos camundongos OATP1C1 *KO* foi observado moderada redução do T4 e normal conteúdo de T3. Isto indica que OATP1C1 contribui marcadamente para a entrada de T4 no SNC de murinos.

É interessante ressaltar que a proteína OATP1C1 não foi detectada em células endoteliais de BHE no cérebro primatas (Ito et al., 2011). Esta observação é apoiada por estudos de imuno-histoquímica que documentaram expressão fraca de OATP1C1 em células endoteliais capilares da BHE nos cérebros humanos (Roberts et al., 2008). Já nas células epiteliais do plexo coróide de humanos e roedores, MCT8 está concentrado na superfície apical destas células e OATP1C1 localiza-se principalmente na superfície baso-lateral (Roberts et al., 2008) Assim, a expressão de OATP1C1 mais pronunciada na BHE e BFCES em camundongos poderia ser a razão para alterações cerebrais suaves em camundongos MCT8 *KO*.

A superfamília de proteínas transmembranares OATP, membro da família dos transportadores de soluto (SLC), medeia o transporte celular independente de sódio dos HTs. Em ratos, foram identificados sete membros desta família (rOAT-K1, rOATP1 até 5) (Hennemann et al., 2001), em humanos onze (Hagenbuch, 2007) e dois em camundongos (mOATP1) (Hennemann et al., 2001). Apesar disso, não se conhece muito bem a distribuição destas proteínas nos tecidos, a regulação expressional e diferenciação funcional de cada uma das Oatps, mesmo nos seres humanos (Svoboda et al., 2011). Sabe-se que a distribuição de OATP pelos tecidos varia entre os diferentes membros da família da OATP. rOATP1 e rOATP2 são expressos no fígado (membrana

basolateral), rim e cérebro (plexo coróide), rOATP4 e hOATP-C são expressos exclusivamente no fígado (membrana basolateral) e rOAT -K1 e rOAT -K2 são expressos seletivamente nos rins (Hennemann et al., 2001).

Em ratos, os achados de Sun et al., (2014), fornecem a primeira evidência direta de que o polipetídeo orgânico transportador de ânions 1 (OATPC1) e MCT8 são fortemente expressos no estroma das vilosidades placentárias destes animais. Estes autores observaram que o RNAm que codifica *Oatp1c1* foi expresso do lado fetal da placenta de ratos e mostrou um aumento quatro vezes maior em um período mais avançado da gestação (dia gestacional 16 x 20). Além disso, as concentrações da proteína *Oatp1c1* aumentaram na porção fetal da placenta durante a deficiência tireoideana materna no dia 16 de gestação (Sun et al., 2014).

Os transportadores de aminoácidos tipo L (LATs) heterodimérico, LAT1 e LAT2 também são conhecidos transportadores de hormônios tireoideanos nos tecidos e estes são membros da superfamília de aminoácidos *polyamine-organocation* (APC) (Kinne et al., 2011). LAT2 esta presente no rim, no intestino, no fígado (Heuer & Visser, 2013) e na placenta (Loubière et al., 2010). LAT2 (system L amino acid transporter 2) é composto pelas subunidades *Slc7a8/Lat2* e *Slc3a2/4F2hc* (Braun et al., 2011b). Este transportador é altamente expresso ao longo da membrana basolateral do epitélio absorptivo do rim e no intestino delgado, mas também é abundante no cérebro (Braun et al., 2011b). Wirth et al., (2009) demonstraram a expressão de LAT2 em cultura de neurônios e durante todo o desenvolvimento de murinos. Em cérebro de camundongos LAT2 é co-expresso com o MCT8 e é especialmente expresso nos neurônios corticais e hipocámpais (Braun et al., 2011a; Wirth et al., 2009). No entanto, diferentemente do que ocorre em roedores, no cérebro humano em desenvolvimento – durante a gestação-, LAT2 é expresso apenas na microglia, mas não em neurônios (Wirth et al., 2009). Consequentemente a ausência de MCT8 pode ter um maior impacto na diferenciação neuronal do SNC de humanos quando comparado ao cérebro de camundongos, uma vez que a presença de LAT2 pode garantir o aporte suficiente de HTs neuronal (Wirth et al., 2009). Assim, é sugerido que os pacientes com AHDS apresentam um fenótipo neurológico devastador da doença devido à ausência de transportadores alternativos para HTs que supram a carência do MCT8. Neste sentido,

ratos MCT8 *KO* apresentam um fenótipo mais brando da doença, provavelmente devido a presença de transportadores alternativos neuronais para os HTs, como o LAT2 (Fu et al., 2013; Roberts et al., 2008; Wirth et al., 2009).

A primeira descrição de camundongo LAT2 *KO* foi recentemente publicada por Braun et al., 2011b e estes autores observaram o aumento da perda urinária de pequenos aminoácidos neutros, deficiência motora leve e desenvolvimento bem como crescimento dos camundongos *Slc7a8* *-/-* aparentemente normal. Além disso, o metabolismo e ação dos HTs pareceu não ser afetado pela perda de LAT2 (Braun et al., 2011b). Visto que LAT2 e MCT8 são co-expressos em muitos tecidos, talvez um camundongo *KO* para ambos os transportadores poderiam exibir um fenótipo mais pronunciado, uma vez que a ausência de um dos transportadores não seria suprida pela presença do outro.

Mais recentemente, Kinne et al., (2015) evidenciaram que *Lat2*, em comparação com outros transportadores de HTs, parece preferir T2 como o substrato. Levando em consideração este achado, *Lat2* pode contribuir para a disponibilidade de HT através da importação e ou exportação de T2, que é gerado pela inativação de T3 ou pela degradação *rT3*, mediada pela desidase.

Além do LAT2, LAT1 é fortemente expresso no pâncreas, tecidos adiposos, mastócitos, placenta e testículos (Heuer & Visser, 2013). Sharlin et al., (2011) demonstraram em camundongos do 3 ao 10 PND a presença de LAT1 nos vasos sanguíneos cocleares e nas células sensoriais ciliadas. Além disso, este transportador está presente no cérebro de camundongos (Braun et al., 2011a), mas mostra um padrão de expressão diferente. A maior expressão de LAT1 é encontrada em estruturas do plexo coróide, bem como em células endoteliais dos capilares da BHE (L. M. Roberts et al., 2008). Seu papel fisiológico no transporte de HTs permanece sendo largamente estudado por meio da investigação de animais com deficiência em LAT1 (figura 18) (Heuer & Visser, 2013).

Dados extraídos do banco de dados genômico de células do cérebro de camundongos por Cahoy et al., (2008), indicam que astrócitos expressam predominantemente OATPC1 e em menor proporção LAT1 e MCT8. Alkemade et al.,

(2011) estudaram cérebros de pacientes pós morte e evidenciaram a presença de imunoreatividade para OATPC1 em células da glia do hipotálamo (ao longo do terceiro ventrículo, especificamente no núcleo paraventriclar e no núcleo supraótico). Wirth et al., (2009) evidenciaram, via imunohistoquímica, a presença de MCT8 em tanicitos e astrócitos em cérebros de camundongos (figura 18 e 19).

No que diz respeito a homeostase de hormônios tireoideanos no cérebro, OATP1c1 e MCT8 são essenciais para esta função (Mayerl et al., 2014). Ambos os transportadores facilitam o tráfego de HTs em mutiplas células (Heuer et al., 2005; Lori M. Roberts et al., 2008; Schnell et al., 2015; Sugiyama et al., 2003; Tohyama et al., 2004; Wirth et al., 2009),e são indispensáveis para a entrada de HTs no cerebro via BHE e BFCES(Trajkovic et al., 2007). De fato, a maior parte de T3 que entra no cerebro é facilitada por MCT8 (Trajkovic et al., 2007), enquanto ambos MCT8 e OATP1c1 contribui para a entrada de T4 (Mayerl et al., 2014). É importante notar que um estudo recente desenvolvido por Mayerl et al., (2014) demonstrou que a ausência de ambos os transportadores (MCT8 e OATP1c1) resulta num cérebro severamente hipotiroideo (redução do conteúdo de T3 e T4 no prosencéfalo).

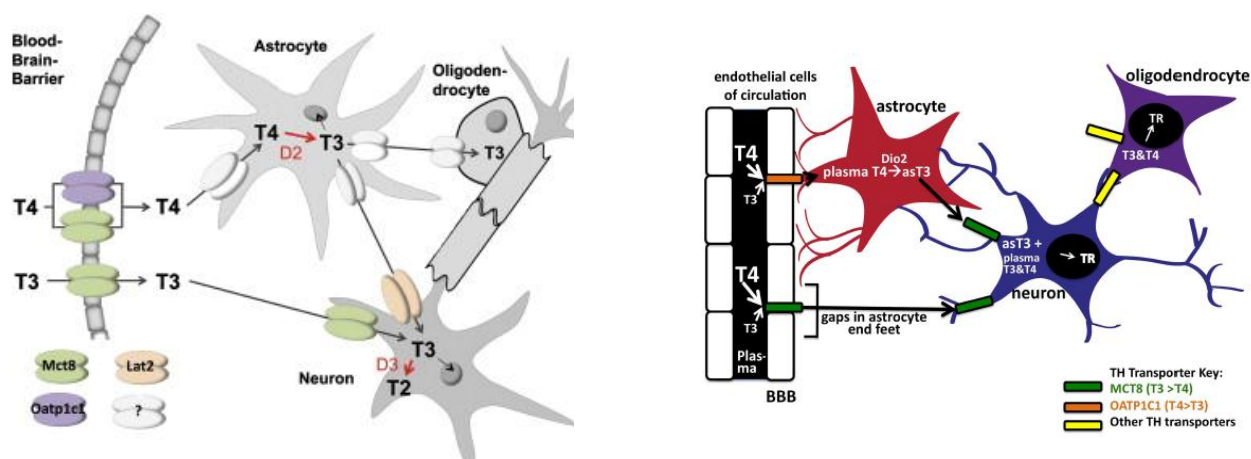


Figura 18. Ilustração esquemática do transporte de HTs no cérebro de ratos. (Heuer a & Visser, 2013) e (Schroeder & Privalsky, 2014)

Assim, como mencionado acima, depois que T4 atravessar a membrana do astrócito, provavelmente via OATP1C1, D2 por sua vez, converte T4 a T3 localmente. Por fim, o T3 gerado no astrócitos entra no citosol das células neuronais via transportador MCT8 para ligar e ativar receptores tiroideanos (TRs). Portanto, é intrigante que a D2 não seja expressa nos neurônios onde os TRs estão localizados (figura 18) (Schroeder & Privalsky, 2014).

Transporter	Species	Areas of the brain	References
Slc16a2 (Mct8)	Mouse	Protein: cortex, hippocampus, cerebellum, choroid plexus, hypothalamus, tanycytes, vessels	(7-9)
	Human	Protein: cortex, hippocampus, choroid plexus, hypothalamus, tanycytes	
		Widespread expression in fetal brain	(6-8, 10-12)
	Rat	Protein: hippocampus, tanycytes, vessels	(8, 11, 13)
	Chicken	Transcript: brain	(14, 15)
	Siberian hamster	Transcript: hypothalamus	(16)
	Rabbit	Transcript: hypothalamus	(17)
	Zebrafish	Transcript: brain	(18, 19)
	Fathead minnow	Transcript: cortex, cerebellum, hypothalamus	(20)
	<i>Xenopus tropicalis</i>	Transcript: brain	(21)
Slc16a10 (Mct10)	Mouse	Transcript: cortex, hippocampus, choroid plexus	(7, 9)
	Human	Protein: cortex, choroid plexus, hypothalamus	(7, 10, 22)
	Rabbit	Transcript: hypothalamus	(17)
	Fathead minnow	Transcript: cortex, cerebellum, hypothalamus	(20)
	<i>Xenopus tropicalis</i>	Transcript: brain	(21)
Slc7a5 (Lat1)	Mouse	Transcript: hippocampus, choroid plexus	(7, 9)
		Protein: cortex, cerebellum	
	Human	Transcript: cortex	(7, 12)
	<i>Xenopus tropicalis</i>	Transcript: brain	(21)
Slc7a8 (Lat2)	Mouse	Protein: cortex, hippocampus, cerebellum, choroid plexus	(7, 9)
	Human	Protein: adult: cortex, hippocampus, choroid plexus; fetal: microglia	(7, 12)
Slc01c1 (Oatp14)	Mouse	Transcript: cortex, hippocampus	(7-9, 23)
		Protein: choroid plexus, tanycytes, vessels	
	Human	Transcript: cortex	(7, 8, 10, 12, 22)
		Protein: choroid plexus, hypothalamus	
	Rat	Protein: choroid plexus, vessels	(8, 24)
	Chicken	Transcript: brain	(14, 15)
	Rabbit	Transcript: hypothalamus	(17)
	Fathead minnow	Transcript: cortex, cerebellum, hypothalamus	(20)
	<i>Xenopus tropicalis</i>	Transcript: brain	(21)

Figura 19. Resumo da expressão dos transportadores transmembrana em varias regioes cerebrais em diferentes espécies (Wirth et al., 2014)

Neste contexto, sabendo da importância dos transportadores de HTs, Van Herck et al., (2015) avaliaram os perfis de expressão ontogenéticos, em ovos de galinha, dos

transportadores de membrana dos HTs, das deiodinases e da transtirretina (TTR) nas barreiras cerebrais (BHE e BFCES) durante o desenvolvimento embrionário (E8- E20) e pós-natal precoce (C1 e C11). Por meio da hibridação *in situ* os autores revelaram a expressão de RNAm para MCT8 e MCT10, OATP1C1 e LAT1 e D3 no plexo coróide. Este achado foi confirmado pelo método de PCR quantitativo que, adicionalmente, indicou aumento na expressão de TTR, D2 e D1 na BFCES. Nos capilares da BHE a hibridação *in situ* revelou expressão de LAT1 e D2 apenas. A presença combinada de LAT1 e D2 em capilares do cérebro sugere que a BHE constitui a principal rota de HTs em cérebros de embriões de galinha. A expressão de múltiplos transportadores, deiodinases e TTR no plexo coróide indica que a BFCES constitui um importante regulador da disponibilidade de HTs para o cérebro.

Os achados destes autores evidenciam também que durante o desenvolvimento embrionário inicial, o cérebro se desenvolve em um microambiente com uma elevada razão T3 / T4 (alto T3 e baixo T4 cerebral quando comparado as concentrações plasmáticas) e é capaz de alterar os níveis de HTs independentemente das mudanças que ocorrem na circulação geral (i.e. as concentrações de T3 se elevam em todo o cérebro do E14 ao E18, quando que no plasma essa elevação se inicia depois do E18)(Van Herck et al., 2015). Assim, é possível observar que a BHE e a BFCES são importantes para o aporte adequado de HTs para o cérebro, em diferentes estágios embrionários e em períodos iniciais da vida pós-natal, e estas garantem o adequado desenvolvimento cerebral nestes períodos.

É importante destacar que o mecanismo de transporte de HTs é heterogêneo. Os transportadores descritos anteriormente transportam T3 e/ou T4 de forma independente de Na⁺, no entanto não existem apenas estes. O polipetídeo co-transportador de Na⁺/taurocolato (Ntcp; Slc10a1) foi descrito por transportar HTs no fígado (Friesema et al., 1999) de ratos e apenas em humanos este é responsável por mediar o transporte de T4 e de iodotironinas sulfatadas (T3S e T4S) (Visser et al., 2010). Ntcp é referido como transportador de HT dependente de Na⁺. Ntcp é constituído de aproximadamente 350 aminoácidos com sete domínios transmembranas (Hagenbuch et al., 1991). O transporte de HTs dependente de Na⁺ em vários tecidos permanece pouco esclarecido, visto que o Ntcp não é difusamente expresso.

2.1.7. Receptores intra-celulares – Ação genômica

Uma vez, no citoplasma celular (após o transporte transmembranar), a ação dos HTs nos tecidos é mediada principalmente por receptores nucleares na célula-alvo. Os receptores para hormônios tireoideanos fazem parte da superfamília de receptores nucleares com fatores de transcrição ativados por ligante, principalmente T3 (Cheng et al., 2010; Souza et al., 2014). . Na verdade, sabe-se que ambos T4 e T3 ligam-se aos receptores nucleares para HTs e levam a mudanças estruturais muito semelhantes, nestes receptores (Sandler et al., 2004).

Existem dois tipos de genes TR (receptores tireoideanos), $THR\alpha$ (NR1A1) (localizado no cromossomo 17) e $THR\beta$ (NR1B1) (localizado no cromossomo 3), que codificam as duas isoformas principais de receptores nucleares dos hormônios tireoideanos, $TR\alpha$ e $TR\beta$, respectivamente (Brent, 2012; Cheng et al., 2010; Darras et al., 2015; Sirakov et al., 2013; Tagami et al., 2010). Os receptores $TR\alpha$, dividem-se ainda em $TR\alpha1$, $TR\alpha2$ e $TR\alpha3$. As três isoformas diferem entre si no comprimento e na sequência de aminoácidos na porção C-terminal (D/E, ou E, vide figura 20). O $TR\alpha2$ é idêntico ao receptor funcional $TR\alpha1$ nos 370 aminoácidos, mas na porção C terminal 40 aminoácidos são substituídos por uma sequência totalmente distinta de 120 resíduos (Tagami et al., 2010). Portanto, a variante de C-terminal de $TR\alpha2$ tem uma incapacidade de se ligar a HT e de funcionar como um fator de transcrição dependente de T3 e , além disso, o $TR\alpha2$ pode atuar como um antagonista para TRs funcionais, tais como $TR\alpha1$ e $TR\beta$, pelo menos em células transfectadas (Koenig et al., 1989; Rentoumis et al., 1990; Schueler et al., 1990; Tagami et al., 1998).

Somente $TR\alpha1$ se liga ao T3 sendo que este último está predominantemente expresso no cérebro e em menor quantidade no pulmão, coração e músculo esquelético, rim e fígado (Brent, 2012; Williams, 2000). $TR\alpha1$ compreende 70-80% de toda a expressão de TR no cérebro adultos vertebrados (Schwartz et al., 1992) e este está presente em quase todos os neurônios. O segundo grupo de receptores, os $TR\beta$, compreendem as variantes $TR\beta1$, $TR\beta2$ e $TR\beta3$ que se ligam a T3 (Brent, 2012). $TR\beta1$ é expresso amplamente (Cheng et al., 2010), principalmente nos rins e fígado e em

menores concentrações no cérebro, coração, pulmão, músculo esquelético e baço (Williams, 2000). TR β 2 é expresso primariamente no cérebro, retina e no ouvido interno. Já o TR β 3 é expresso no rim, fígado e pulmão (Cheng et al., 2010). As isoformas de TR β diferem no comprimento e nas sequências de aminoácidos no domínio amino-terminal (A/B, vide figura 20). Na verdade, podemos considerar receptores para hormônios tireoidianos, no sentido literal da palavra, somente as isoformas TR α 1, TR β 1 e TR β 2, por se ligarem ao T3 e ativarem ou inibirem a transcrição gênica (Fraichard et al., 1997). A isoforma TR α 2 não se liga ao T3 por não possuir o sítio de ligação para o ligante (HDB) (Sirakov et al., 2014). TR $\Delta\alpha$ 1 e TR $\Delta\alpha$ 2 são TRs truncados, sem os domínios terminais A/B e DNA mas que preservam os domínios de ligação com T3 (Plateroti et al., 2001).

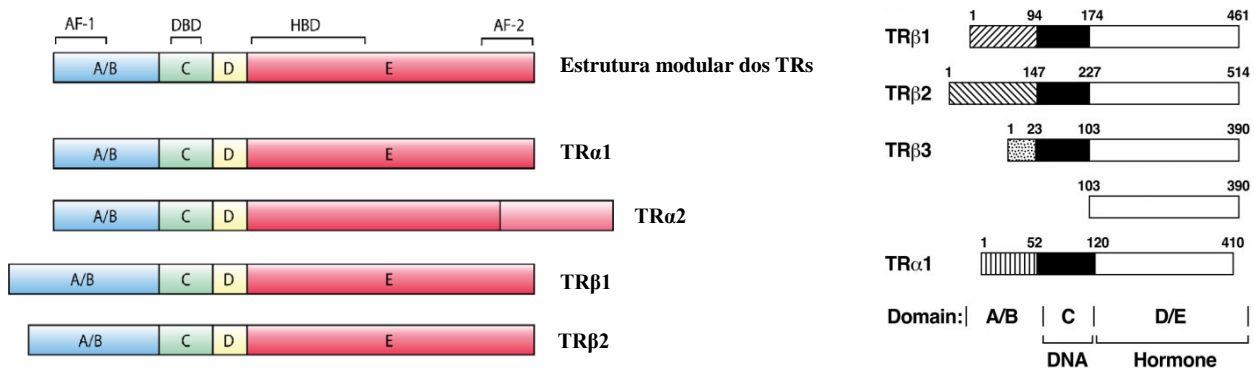


Figura 20. Representação esquemática das isoformas TR α e TR β . A figura mostra os diferentes domínios envolvidos na função dos TRs. Isso inclui o domínio de ligação ao DNA (DBD) e o domínio de ligação ao hormônio (HBD) (carboxi-terminal). Outras regiões funcionais dos TRs incluem o domínio de ligação ao co-fator (localizado em A/B, D, e E) e o domínio de dimerização (localizado em C e E). A activação do domínio AF-1 e AF-2 são importantes para a ativação transcricional (Sirakov et al., 2014; Cheng et al., 2010).

Sobre os receptores para HTs, é importante destacar que Tagami et al., (2010) identificaram um novo receptor para HT (designado TR β 4), o qual não se liga a T3, mas pode inibir a ação deste hormônio mediada pelos TRs funcionais. TR β 4 compartilha uma arquitetura estrutural comum do N-terminal, domínio A/B, domínio DBD (de ligação ao DNA) a um receptor funcional TR β 1, para os primeiros 246 aminoácidos. No entanto a porção C-terminal 215 aminoácidos são substituídos por uma sequência totalmente distinta de 137 resíduos (Moriyama et al., 2016; Tagami

et al., 2010). Foi detectado que TR β 4 está presente em todos os tecidos humanos adultos examinados, com maior expressão no cérebro e rins (Tagami et al., 2010). No entanto, ainda não existem informações sobre a expressão desta isoforma no período fetal (Moriyama et al., 2016). Portanto, a variante de C-terminal TR β 4 não é capaz de se ligar hormonal e para funcionar como um factor de transcrição dependente de T3. TR β 4 exerce a sua função de antagonista contra TR β 1 mesmo na ausência de interações proteína-proteína com T3 ou cofactores (Moriyama et al., 2016). Assim, TR β 4/ TR β 1 (heterodímero) ou TR β 4/ TR β 4 (homodímero) pode competir com TR β 1/RXR (heterodímero) para acessar o gene alvo e/ou para a ligação aos factores de transcrição (Moriyama et al., 2016). Na luz destes conhecimentos, mais estudos devem ser desenvolvidos a fim de se compreender melhor os mecanismos de ação do TR β 4 (Moriyama et al., 2016). Assim, podem ser requeridos genes *knockouts* TR β 4 ou *over expression* em camundangos transgenicos com a finalidade de melhor explicar o papel fisiológicos do TR β 4 (Moriyama et al., 2016).

Quase todos os receptores de hormônios tireoideanos têm maior afinidade para T3, em comparação com T4 (a afinidade dos TRs por T3 é 15 vezes maior do que T4, embora as concentrações circulantes de T4 seja quatro vezes maior do que a de T3 (Lin et al., 1990)) , fazendo T3 o hormônio ativo predominante nas concentrações dos receptores nucleares de hormônios tireoideanos na maioria dos vertebrados (Darras et al., 2015).

Hormônios tireoideanos (HTs) exercem seu efeito pela ligação aos receptores (TR α ou β), o qual se liga a uma específica sequência de ácido desoxirribonucléico (DNA) denominada elementos responsivos a hormônio tireoideanos (TRE) regulando a expressão de genes alvo (Sirakov et al., 2014). Os receptores de HTs se ligam a sequências específicas de DNA, denominadas TREs, que são geralmente localizadas nas regiões não codificantes do genoma dos genes-alvo (Sirakov et al., 2014). Receptores tireoideanos se ligam a TREs não só como homodímeros mas também como heterodímeros com outros membros da superfamília de receptores, tal como o receptor retinóide X (RXR), o receptor da vitamina D, e todos os subtipos de receptores do ácido retinóico (Cheng et al., 2010). Assim, a heterodimerização com RXR aumenta significativamente a ligação de receptores de HTs com TRE, aumentando assim a

responsividade do receptor ao T3 e aumentando a ativação transcripcional (figura 21) (Zhang & Kahl, 1993).

Os receptores tireoideanos estão ligados a TRE na presença ou ausência de HTs. A interação de T3 com receptores de HTs provoca alterações conformacionais nestes receptores e ativação (ou, por vezes, a supressão) de genes que codificam proteínas alvo (Brent, 2012). Devido à distribuição difusa de RXR e sua promiscuidade em heterodimerização com vários receptores, a heterodimerização com RXR proporciona um meio para os receptores tireoideanos “conversarem” com outros receptores (Cheng et al., 2010).

Na ausência de T3, TRs podem interagir com as proteínas correpressores para inibir genes alvo regulados positivamente (Sirakov et al., 2013). Estas proteínas correpressoras interagem com a porção C-terminal dos receptores tireoideanos quando não ligados a T3 e reprimem a transcrição gênica. Essas proteínas são chamadas de correpressoras (CoRs) e são elas: 1. NCoR – nuclear hormone receptor-corepressor, NCoR1; e 2. (nuclear receptor corepressor, NCoR1) e SMRT - silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors, NCoR2 (Astapova & Hollenberg, 2013). A porção N-terminal de ambas NCoR e SMRT medeia a repressão transcripcional e a porção C-terminal medeia as interações destas proteínas com os receptores tireoideanos e outros receptores nucleares (NR) (Astapova & Hollenberg, 2013). Estes correpressores fazem contato direto com o domínio da repressão encontrado em muitos sítios de ligação ao ligante/hormônio (HBD) dos receptores de HT. SMRT e N-CoR recrutam histone deacetylases (HDACs) (Privalsky, 2004). Isso cria uma conformação da cromatina fechada para maquinaria transcripcional levando à repressão da transcrição (Privalsky, 2004).

Na presença de T3, classicamente os correpressores são deslocados e as proteínas coativadoras (tais como coativadores da família dos receptores esteróides - SRC-1, -2, e -3) são recrutadas e se ligam ao complexo receptor de HT ligado ao ligante (T3), permitindo a ativação de genes alvos dependentes de T3 (Cheng, 2000). Estes coativadores recrutam a maquinaria para permitir a ativação da expressão gênica (Pascual & Aranda, 2013; Vella et al., 2014).

Os coativadores podem ser classificados em quatro grupos: 1. modificadores de histonas covalentes, tais como a família p160, CARM, e do PFC / p300, que possuem (ou recrutam) atividades enzimáticas capazes de modificar o modelo de cromatina, incluindo acetilases e metilases; 2. complexo de remodelamento dependente de ATP, tais como família Swi/Snf, que alteram estruturas de alta ordem e a posição dos nucleossomos; 3. componentes do complexo mediador, como TRAP/DRIP, que interage com a maquinária transcripcional para auxiliar a montagem do complexo de pré-iniciação; e 4. coativadores com função desconhecida (figura 22) (Chen et al., 1999; DiRenzo et al., 2000; Shang et al., 2000; Sharma & Fondell, 2002, 2000; Struhl, 2001; Yang et al., 2000). Diferentes coativadores podem preferencialmente ser recrutados por vários receptores nucleares e alternativamente, um único receptor pode recrutar mais do que um coativador, simultaneamente ou sequencialmente.

Alguns coativadores são fatores de remodelamento da cromatina ou possuem atividade modificadora de histonas, tais como acetilação ou metilação da arginina, ao passo que outros interagem com a maquinaria transcripcional de base e pode recrutar a RNA polimerase II do promotor alvo (Pascual & Aranda, 2013).

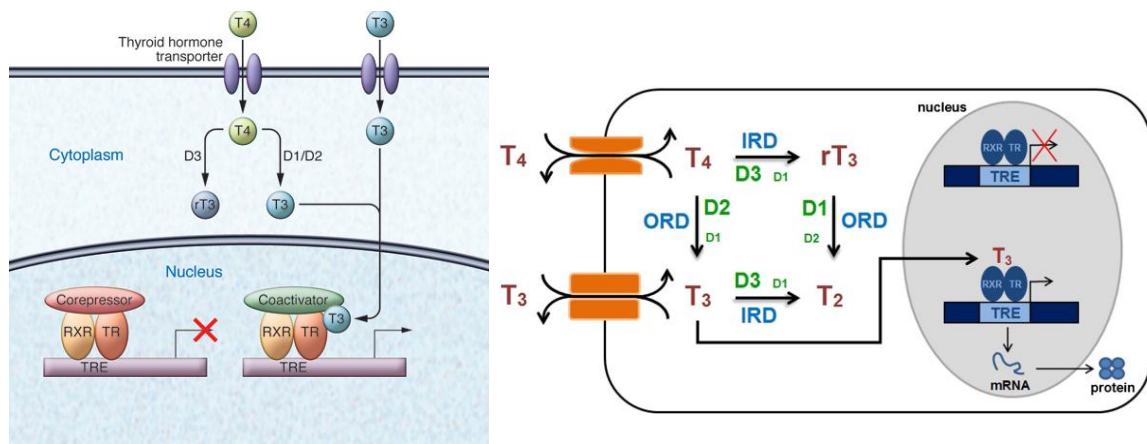


Figura 21. Mecanismo de ação dos hormônios tireoideanos. TR não ligado e heterodimerizado com RXR liga-se a uma unidade responsiva (TRE) e em seguida a um co-repressor de receptores nucleares (NCoR) ou SMRT, reprimindo a expressão do gene. Quando o T3 se liga ao TR ocorre interrupção da ligação com o co-repressor e promoção da ligação com o co-ativador, que leva a transcrição gênica. (Brent, 2012; Darras et al., 2014).

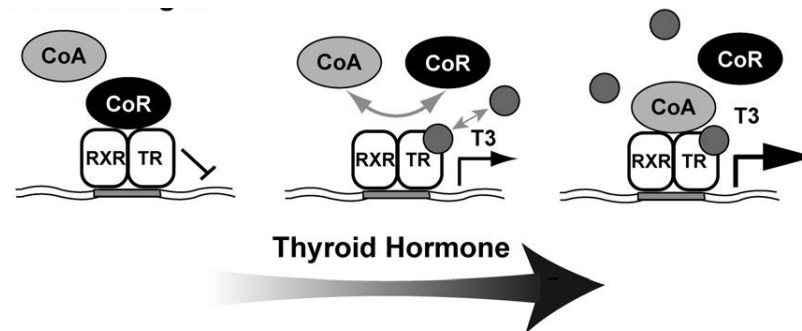


Figura 22. Modelo de regulação da transcrição. Na presença de concentrações elevadas de TH (superior direito), a maioria dos receptores ligam TH que induz a alteração conformacional que leva à liberação de co-repressores e recrutamento de coativadores maximamente para activar a transcrição. Em concentrações intermédias de TH correspondentes a um estado eutiroides (média superior), apenas alguns dos receptores ligam o ligando. O complexo entre TR, hormônio, coativadores e co-repressores está em um equilíbrio dinâmico em que atinge a ativação moderada de transcrição. Remoção de co-repressores Neste resultados estaduais para o aumento da disponibilidade de TR para o ligando e coativadores, levando ao aumento da sensibilidade ao hormônio (Astapova & Hollenberg, 2013).

2.1.8. Ação não genômica

Uma quantidade crescente de evidências mostra que muitos dos efeitos de T3 são iniciados fora do núcleo e envolvem diferentes vias de transdução de sinalização (Davis et al., 2016, 2008; Davis & Davis, 2002; De Vito et al., 2012; Hiroi et al., 2006). Estes efeitos são mediados por ações não genômicas (Senese et al., 2014). Os processos não genômicos gerais são mal compreendidos, mas surgem como importantes mecanismos acessórios das ações nucleares dos HTs e têm sido observadas na membrana plasmática, no citoplasma e em organelas (como mitocôndrias) (Cheng et al., 2010; Wrutniak-Cabello et al., 2001). Os receptores de membrana para HT (T4) foram identificados e consistem em uma integrina específica $\alpha V\beta 3$ ($\alpha V\beta 3$) (Figura 23). $\alpha V\beta 3$ é a integrina mais abundante expressa em células de mamíferos (Cody et al., 2007). A integrina $\alpha V\beta 3$ consiste em uma glicoproteína transmembrana heterodimérica não covalente no qual inúmeras proteínas da matriz extracelular interagem com o domínio extracelular da integrina e o domínio intracelular está conectado ao citoesqueleto (Bergh et al., 2005). A matriz extracelular possui ligantes/proteínas que reconhecem a sequência de peptídeos arginina-glicina-aspartato (RGD) desta integrina (Bergh et al., 2005).

A integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ possui dois sítios de ligação a HT denominados Sítio 1 (S1) e 2 (S2) (Davis et al., 2011). Os domínios consistem em dois sítios de ligação aos HTs que estimulam vias de transdução distintas (figura 23) (Davis et al., 2011). S1 se liga a T3 e S2 a T4 e mais fracamente a T3 (Davis et al., 2011). A ligação de T3 a S1 leva a fosforilação e ativação da Src e consequentemente do fosfoinosítídeo-3-quinase (PI3K) e a ligação de T4 ou T3 a S1 ativa a via serina–threonina kinase (MAPK/ERK1/2) (Moeller & Broecker-Preuss, 2011) o que promove translocação do receptor $\text{TR}\alpha$ para o núcleo e acúmulo de fator indutor de hipóxia (HIF-1) (Lin et al., 2009). A ligação de HTs no sítio S2 da $\alpha\text{v}\beta 3$ promove aumento da angiogenese (Bergh et al., 2005), proliferação de gliomas (Davis et al., 2006), proliferação de células papilares e foliculares do câncer da tireoide (Lin et al., 2007) e translocação do $\text{TR}\beta$ do citoplasma para o núcleo (Lin et al., 2009). Aqui é importante ressaltar que tetraidotiroacético (tetrac) é um análogo do T4 e inibe a ligação dos HTs a $\alpha\text{v}\beta 3$ e assim constitui um antagonista deste receptor (Bergh et al., 2005). Outra importante ação não genômica dos HTs é a ativação do PI3K via $\text{TR}\beta$ ligado a T3 (Moeller & Broecker-Preuss, 2011) (Figura 24). A ativação do PI3K por $\text{TR}/\text{T3}$ e subsequente fosforilação de proteínas kinases como Akt e p70^{s6k} leva a indução gênica.

Todos estes mecanismos potencialmente influenciam a expressão gênica. A etapa inicial de ativação da via por HTs é não genômica, mas as consequências incluem o aumento da transcrição de determinados genes independentes de TREs, os genes - alvo são então induzidos não classicamente por HTs (Moeller & Broecker-Preuss, 2011). Portanto, a distinção entre as ações não genômicas e genômicas se refere ao local de início da ação e não diz respeito se ocorrerá ou não a transcrição gênica (Davis et al., 2011).

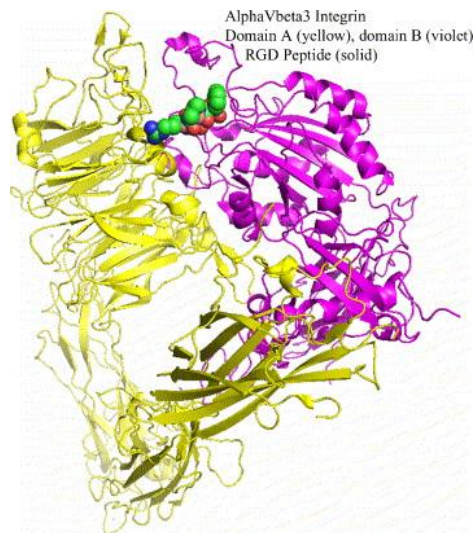


Figura 23. Estrutura da integrina alfaVbeta3 ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$) (Cody et al., 2007).

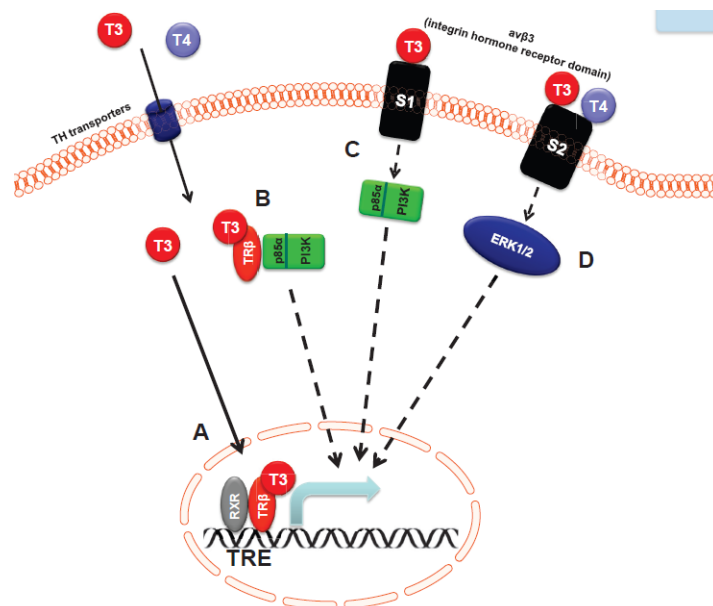


Figura 24. Ação não genômica dos hormônios tireoideanos (Moeller & Broecker-Preuss, 2011).

2.1.9. Hormônios tireoideanos “não clássicos”

Além T3, existem HTs “não clássicos” que geram efeitos biológicos distintos se ligando aos TRs com afinidades distintas ou por outras vias, são eles: Triac, tetrac, Thyronaminas, rT3 e 3,5-diiodo-L-thyronine (T2) (figura 27). **Triac**

(triiodotiroacético) é produzido pelo fígado e outros tecidos e constitui o produto do metabolismo de T₃. Este é um agonista seletivo fraco do TR β com afinidade de 1,5 vezes pelo mesmo (Schueler et al., 1990). Triac já foi utilizado em pacientes resistentes a HTs (Kunitake et al., 1989), visando a inibição da secreção de TSH e em pacientes obesos com o objetivo de elevar o metabolismo destes (Dumas et al., 1982). Por sua vez, o **Tetrac (tetraiodotiroacético)** tem sido estudado como o potencial substituidor do T₄ para tratamento do mixedema e pelo seu efeito de melhoria sobre o metabolismo periféricos dos lípidos nos seres humanos (Senese et al., 2014). O tetrac também tem sido usado clinicamente para o tratamento da resistência aos HTs (Anzai et al., 2012). Tetrac parece não depender de MCT8 para atravessar a membrana plasmática. Tetrac pode substituir o T₃ para restaurar o adequado desenvolvimento do cérebro fetal em camundongos MCT8-null (Horn et al., 2013).

As estruturas dos **thyronaminas** (TAMs) (figura 25), uma nova classe de moléculas de sinalização endógenas da tiróide, diferem de T₄ e dos derivados de TH deiodinados pela ausência de um grupo carboxilato na cadeia lateral de alanina (Senese et al., 2014). Descarboxilação de iodotironinas em iodotironaminas não foi demonstrado diretamente, e o aminoácido aromático descarboxilase foi inábil para catalizar a descarboxilação da iodotironina (Hoefig et al., 2012). 3 - Iodothyronamine (T1AM) foram detectadas *in vivo* no soro de roedores e humanos (DeBarber et al., 2008; Galli et al., 2012; Hoefig et al., 2011; Lehmpful et al., 2014; Scanlan et al., 2004), no fígado de rato (Saba et al., 2010), cérebro em ratos (Scanlan et al., 2004) e coração *in vitro* (Chiellini et al., 2007; Saba et al., 2010).

Dados de Piehl et al., (2008) demonstram o papel das deiodinases na biossíntese das TAMs. Contrariamente Ackermans et al., (2010) não evidenciaram a presença de ¹³C₆-T1AM em amostras de plasma e cérebros de ratos tratados com ¹³C₆-T₄. Neste contexto, T1AM ou T0AM não foram detectadas no plasma de ratos e na tireoide de seres humanos (Ackermans et al., 2010). Assim, as vias responsáveis pela biossíntese do T1AM continuam incertas (Zucchi et al., 2014). Hackenmueller et al., (2012) sugerem que T1AM não é um metabolito extratireoidiano de T₄, segundo os autores T1AM é produzido na tiróide através de um processo que requer NIS e tireoperoxidase, os mesmos fatores necessários para a síntese de T₄. Estes dados lançam uma nova luz

sobre os caminhos potencialmente envolvidos na produção T1AM e evidenciam que a conversão enzimática de iodotironina para iodothyronamina não é simples (Senese et al., 2014). Os receptores das TAMs permanecem sem identificação (Senese et al., 2014).

Verificou-se que T1AM constitui um agonista potente do receptor associado a amina traço 1 (TAAR1), um receptor orfão acoplado a proteína G (Zucchi et al., 2006). O termo “amina traço” é usado para se referir a compostos que estão presentes em tecidos de mamíferos em muito baixas concentrações (nanomolar) (Zucchi et al., 2006). Estudo utilizando células COS-1 (célula semelhante a fibroblasto) transfectadas com multiespecíficos OATPs (1A2, 1B3 e 1C1) e os específicos transportadores de HTs, MCT8 e MCT10, provou que T1AM inibe diferencialmente a captação celular de T3 e T4 por estes transportadores (Ianculescu et al., 2010). T1AM também inibe a captação de ambos T3 e T4, via MCT8, o transportador de HTs mais específico. Em contrapartida, T1AM não tem efeito no transporte de HTs por OATP1B3 e MCT10 (Ianculescu et al., 2010). Sabendo que OATP1A2, OATP1C1 e MCT8 estão presentes no cérebro, T1AM pode ter um papel na entrega de HTs e na atividade destes hormônios em regiões alvo do SNC (Ianculescu et al., 2010).

Ademais, foi evidenciado que uma injeção de T1AM (i.p) promove redução da temperatura corporal (Scanlan et al., 2004) e em coração isolado o T1AM promove redução de frequência cardíaca e pressão arterial sistólica (Chiellini et al., 2007; Frascarelli et al., 2008). Acrescido a isto foi demonstrado que a administração sistêmica de T1AM (i.p., 50mg/kg) em ratos promoveu aumento da glicose, glucagon e corticosterona plasmática sem afetar a insulina (Klieverik et al., 2009). Comparado com administração i.p. de T1AM, a dose 100 vezes menor administrada centralmente (0,5 mg/kg) induziu a um aumento mais pronunciado produção de glicose endógena e da hiperglucagonemia, enquanto a insulina plasmática tendeu a reduzir. Ambas sistêmica e central infusões de T0AM promoveu menor aumento da produção de glicose endógena e glucagon quando comparado a T1AM (Klieverik et al., 2009). Estes dados indicam que as thyronaminas podem agir centralmente para modular o metabolismo da glicose. No cérebro T1AM também promove a melhora na aquisição e consolidação da memória, melhora o aprendizado, aumenta a glicemia plasmática (dependente da dose)

e reduz o limiar de dor para estímulo térmico, sem modificar as concentrações cerebrais de T3 e T4 (Manni et al., 2013).

O **rT3** é um iniciador potente da polimerização de actina em astrócitos. Farwell et al., (2005) mostraram que o conteúdo celular de F-actina e a sua organização em cultura de neurônios cerebelares é regulado por rT3 e também por T4. Na última década o **3,5-di-iodo-L-tironina (T2)**, um metabolito endógeno de T3 e rT3, presente em uma concentração significativa nanomolar no soro humano (Lehmphul et al., 2014) vem recebendo grande atenção (Jonas et al., 2015). Até o momento não se sabe ao certo qual a desidase cataliza a conversão para 3,5-T2, mas a provável candidata é a D2 (Orozco et al., 2014) (figura 26).

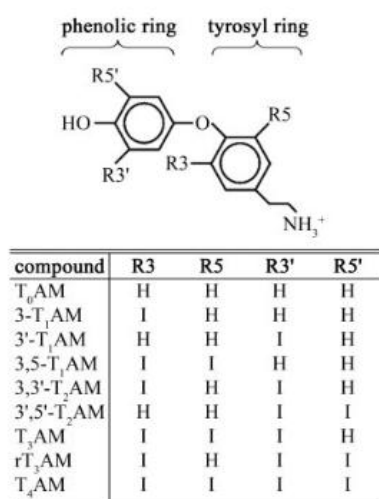


Figura 25. Estrutura e Nomenclatura das Tironaminas (Piehl et al., 2008).

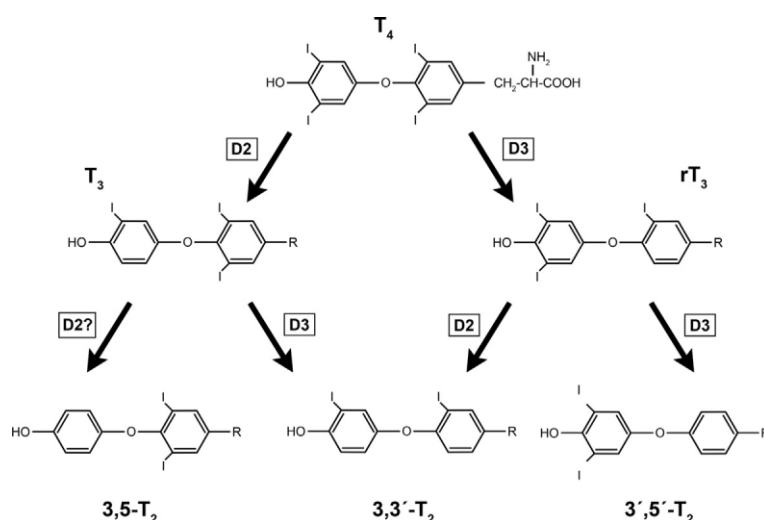


Figura 26. Formação de T2 (Orozco et al., 2014).

Non-classical thyroid hormone	Affinity for/transactivation through TR α or TR β	Affinity for other receptors
Triac T1AM	High (Schueler <i>et al.</i> 1990) Absent (Chiellini <i>et al.</i> 1998)	None yet identified High (trace amine-associated receptor 1 (TAAR1); Zucchi <i>et al.</i> 2006)
rT ₃ T ₂	High ^a (TR $\Delta\alpha$ 1 (native TR isoform); Flamant & Samarut 2003) Weak (human TR α ; Cioffi <i>et al.</i> 2010) Weak (human TR β ; Ball <i>et al.</i> 1997, Cioffi <i>et al.</i> 2010, De Lange <i>et al.</i> 2011, Mendoza <i>et al.</i> 2013) High (short TR β of tilapia fish; Mendoza <i>et al.</i> 2013, Navarrete-Ramirez <i>et al.</i> 2014)	None yet identified None yet identified

^aNongenomic action.

Figura 27. Envolvimentos dos TRs ou receptores alternativos na ação de hormônios tireoideanos não clássicos (Senese et al., 2014).

2.2.DESENVOLVIMENTO DA TIREÓIDE

2.2.1.Humanos

Os primórdios da tireóide, primeira glândula a se desenvolver no embrião humano (Trueba et al., 2005), surge por volta do 16°-17° dia de gestação (Chung, 2014) a partir do espessamento do assoalho da faringe, entre a bifurcação da aorta. Por volta do 48° dia de gestação a tireóide finalmente atinge a sua posição em frente à traquéia e abaixo da cartilagem cricóide e então começa a formar folículos (Trueba et al., 2005). Assim, por volta da 10^a-11^a semana após a concepção, a tireóide torna-se hábil a

incorporar iodo aos hormônios tireoidianos e sintetizar T4 (Trueba et al., 2005). Mais adiante, com a evolução da gestação, o volume da tireóide aumenta progressivamente

Como dito anteriormente, a embriogênese da glândula tireóide humana está praticamente concluída em 10 a 12 semanas de gestação, e neste período, pontos minúsculos precursores do folículo são visíveis (Ballabio et al., 1989). Os hormônios da tireóide são detectáveis no soro fetal a partir da 12ª semana de gestação (Chung, 2014). Nesse período, T4 e T3 são mensuráveis (Contempré et al., 1993). No entanto, uma grande proporção de hormônios detectáveis derivam da mãe através de transferência placentária (Contempré et al., 1993). Sendo importante destacar que o crescimento inicial e desenvolvimento da tireóide fetal parece ser, em geral, independente do TSH (Kratzsch & Pulzer, 2008). Uma vez que os níveis de TSH e T4 aumentam a partir da 12ª semana de gestação até o parto, os níveis de triiodotironina (T3) permanecem relativamente baixo (Kratzsch & Pulzer, 2008). Dados publicados por Thorpe-Beeston et al., (1991) demonstram que os níveis fetais de T4 na 12ª semana são de 26 nmol/L e estes se elevam para 240nmol/L até o nascimento. Segundo estudo de Calvo et al., (2002) a concentração de T3 no fluido amniótico fetal é cerca de 10 vezes menor do que a de T4.

Durante a gestação, há um aumento gradual dos níveis de hormônios da tireóide. A elevação das concentrações séricas de hormônios tireoideanos ocorre devido ao aumento da estimulação e maturação da glândula tireóide bem como ao aumento das concentrações séricas da globulina ligadora de tiroxina (TBG) e alcança os níveis adultos no terceiro trimestre. Segundo estudo realizado por Thorpe-Beeston et al., (1991) as concentrações totais e livre de T4 fetal, alcançam as concentrações da fase adulta por volta de 36 semanas de gestação, já as concentrações livres e totais de T3 serão sempre menos da metade das concentrações maternas. Segundo os mesmos autores, as concentrações séricas do feto de TSH são detectáveis já na 12ª semana gestacional e aumentam significativamente durante a gestação (aumento moderado de TSH ao longo dos últimos dois trimestres para níveis de 6 a 8 mU / L no parto) e foram sempre maiores que as concentrações maternas.

Enquanto TBG pode ser identificado na glândula tireóide fetal por volta da 5ª semana de gestação, a maturação da secreção de tireoglobulina leva muito mais tempo (De Nayer et al., 1984; Sobrero et al., 2007). Segundo o trabalho de Thorpe-Beeston et al., (1991), as concentrações fetais de TBG se elevam com a evolução da gestação e alcançam os níveis adultos no terceiro trimestre. Este aumento provavelmente reflete a maturação funcional do fígado para produzir proteína. A globulina ligadora de tiroxina (ou TBG, do inglês *thyroxine-binding globulin*) é uma das três proteínas (juntamente com a transtirretina e a albumina) responsáveis pelo transporte dos hormônios tireoidianos, T4 e T3 na corrente sanguínea. Ao longo da gestação, também há aumento nas taxas de albumina fetal (Thorpe-Beeston et al., 1991).

Embora a capacidade para concentração de iodeto pela tireoide, possa ser detectada na tireóide da 10ª a 11ª semana do feto, a capacidade da glândula tireóide fetal para reduzir aprisionamento iodeto em resposta ao excesso de iodeto (efeito Wolff Chaikoff) não aparecem até a 36ª- 40ª semana de gestação (Chung, 2014). O tirotrofos fetais respondem ao TRH por volta de 25 semanas de gestação. A maturação do controle de *feedback* negativo da síntese de hormônios da tireóide ocorre por volta do meio da gestação (Thorpe-Beeston et al., 1991).

Considerando que a entrega de TSH maternos para o feto, via passagem transplacentária, é desprezível, baixos níveis de T3 e T4 fetal são diretamente influenciados pelas fontes disponíveis de hormônio na circulação materna. Assim, a disponibilidade reduzida de T4 de origem fetal (hipotireoidismo fetal) é largamente compensada pelo hormônio tireoideano materno que atravessa a barreira placentária. Este efeito é possível, apesar do fato de que apenas 1% do T4 materno pode passar a barreira placentária (Vulsma et al., 1989)

Durante a gestação, as concentrações circulantes de T4 e do seu metabólito ativo, T3, são baixos, enquanto os metabólitos inativos, rT3 e sulfato de T3, são elevados. Este padrão é uma consequência da imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise - tireóide e de ajustes coordenados na atividade das desidases. As concentrações D1, que catalisa T4 à conversão T3, são baixas ao longo da gestação. As concentrações de

D2, que converte T4 para T3, e de D3, um deiodinase de inativação que converte T4 para rT3, são elevadas (Kester et al., 2004)

Apesar das baixas concentrações circulantes de T3, por 20 a 26 semanas de gestação, os níveis de T3 no cérebro fetal, neste período, já estão próximos de 60% a 80% dos valores dos adultos. Embora a significância fisiológica de concentrações circulantes T3 baixo ao longo da gestação é desconhecida, tem sido sugerido que a sua função pode visar potencializar o estado anabólico do rápido crescimento feto (Chung, 2014) (vide figura 28 para resumo do desenvolvimento da tireoide em humanos).

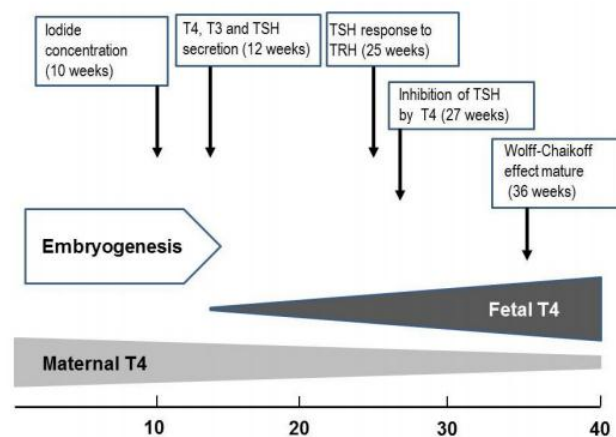


Figura 28. Linha do tempo do desenvolvimento da glândula tireoide em humanos (Chung, 2014).

2.2.2.Ratos

Em ratos, a glândula tireoide já se encontra bem formada, porém não completamente, no 17º dia embrionário e neste período ela já é capaz de concentrar tireoglobulina e iodeto, apesar do conteúdo ainda muito pequeno (Feldman et al., 1961). Estudo desenvolvido por Feldman et al., (1961) sugeriu que a tireoide do rato encontra-se pronta para a produção hormonal por volta do vigésimo dia embrionário, quando esta adquire a maior parte das características de uma glândula adulta (Feldman et al., 1961).

Relatos experimentais demonstraram que os embriotrofoblastos do rato apresentavam uma concentração de 21% do valor de T4 e 54% do valor de T3 materno

(Woods et al., 1984). Os níveis totais de T3 e T4 aumentam significativamente do 18º dia gestacional até o nascimento devido a maturação da glândula tireóide. Após o nascimento, os níveis plasmáticos de T4 sobem de forma acentuada até atingir um pico no décimo sétimo dia pós-natal (Fisher et al., 1976), seguidos por uma elevação, em paralelo, dos níveis de T3, que irão atingir seu pico por volta do vigésimo oitavo dia pós natal. Os níveis totais de T3, que serão padrão em ratos adultos, são alcançados no quadragésimo dia pós-natal.

Os hormônios tireoideanos são fundamentais para o desenvolvimento do cérebro (Solis & Valverde, 2006). O início do desenvolvimento do tubo neural em ratos, por volta do oitavo dia embrionário, coincide com o início do desenvolvimento da tireóide e, de certa forma, com o surgimento dos receptores para hormônios tireoideanos. O RNAm responsável pela produção dos receptores para HTs, foi detectado no SNC de ratos, durante o desenvolvimento embrionário, por volta do décimo primeiro e décimo quinto dia de gestação, e a proteína foi detectada em diferentes regiões do cérebro de ratos no décimo quarto dia embrionário (Bradley et al., 1992). Durante o mesmo período, décimo dia embrionário, inicia-se a neurogênese central.

O cérebro fetal do rato é impermeável a T3 , todo o T3 cerebral deriva do T4 . T4 materno atravessa a placenta, e a barreira hemato-encefálica , gerando T3 localmente no cérebro fetal . T3 materno também atravessa a placenta e atinge diversos tecidos fetais, mas não o cérebro (Calvo et al., 1990; Grijota-Martínez et al., 2011). A razão pela qual o cérebro do feto do rato não é permeável a T3 é desconhecida , e não é devido à fraca expressão do transportador MCT8 (Grijota-Martínez et al., 2011). Em fetos de ratos o T3 cerebral deriva da conversão de T4 , mas no período pós-natal e adulto , o T3 cerebral deriva em parte do sangue e em parte da deiodação do T4. Dados de Calvo et al., (1990) evidenciaram que a administração de T3 não conseguiu aumentar a concentração de T3 no cérebro fetal , enquanto que a administração de T4 normalizou eficientemente a concentração de T4 no cérebro fetal.

2.3.INDUÇÃO DO HIPOTIREOIDISMO

O hipotireoidismo na maioria das vezes é resultante de um defeito ou uma destruição da glândula tireoide que pode ser congênito ou adquirido (hipotireoidismo primário). Esta condição patológica, também pode ter origem hipofisária, por deficiência na secreção de tireotrofina - TSH (hipotireidismo secundário), hipotalâmica por deficiência na liberação do hormônio liberador da tireotrofina - TRH (hipotireoidismo terciário) e também devido à resistência generalizada ou parcial dos tecidos aos HTs (Brenta et al., 2013).

Drogas antireoidianas (e.g.: MTZ e PTU) têm valioso uso clínico para o tratamento de desordens relacionadas ao hipertireoidismo. Experimentalmente, no entanto, constituem importantes ferramentas para simulação de condições de hipotireoidismo. O MTZ reduz as concentrações plasmáticas de HTs por inibir a incorporação de iodo em resíduos tirosil de tireoglobulina, o acoplamento de resíduos tirosil iodados, e assim impedindo a formação de iodotironinas (Goodman LS et al., 2007). Vale ressaltar que seus efeitos só se tornam aparentes quando o hormônio pré-formado é metabolizado (Goodman LS et al., 2007).

Ambos, o PTU e o MTZ, atravessam igualmente a barreira placentária e também podem ser encontradas no leite materno. Estudo realizado por Diav-Citrin & Ornoy (2002) (Diav-Citrin & Ornoy, 2002) não encontrou diferença entre o estado da tireóide fetal de filhos de mulheres tratadas com PTU ou tratadas com MTZ. No entanto, ambas causam hipotireoidismo fetal em humanos. Este é geralmente transitório com um retorno ao estado eutireóideo dentro de alguns dias ou semanas após o nascimento (Kriplani et al., 1994; Vanderpump et al., 1996).

2.4.TIREOIDE E GESTAÇÃO

Mudanças fisiológicas durante a gestação promovem variações nos resultados dos testes da função tireoideana (Maraka S et al., 2015). (Maraka S et al., 2015). O critério para o diagnóstico da disfunção tireoideana está nos intervalos de nível de TSH. Especialistas recomendam a definição de intervalos de referência para este hormônio

específicas para cada trimestre e para cada região (cidade/estado/país). Na ausência dos valores locais, deve ser adotado, para o primeiro trimestre, um valor superior de normalidade de 2.5mIU/L (Stagnaro-Green et al., 2011). A modificação do limite superior de normalidade do TSH na gestação (que passou de 4.0 mIU/L para 2.5mIU/L a 3.0 mIU/L, a depender do período gestacional), critério importante para o diagnóstico de hipotireoidismo neste período, resultou em um aumento de pelo menos cinco vezes na prevalência de hipotireoidismo (Maraka S et al., 2015). Assim, atualmente a prevalência de hipotireoidismo (clínico e subclínico) durante a gestação varia em cada país, porém estima-se que esta esteja em torno de 5.5 a 15% (Blatt et al., 2012; Ong et al., 2014a). Sendo importante destacar que já foi identificado uma prevalência de hipotireoidismo clínico e subclínico de 34.5% em gestantes do Egito (Ahmed et al., 2014), a maior já identificada até o momento.

Neste sentido, estudos epidemiológicos têm evidenciado a estreita relação entre modificações nas condições de desenvolvimento intrauterino, ou nos primeiros anos de vida com a incidência de determinadas doenças que acometem os indivíduos na vida adulta (Barker et al., 1989). Paralelamente, inúmeras distúrbios orgânicos, comumente diagnosticadas atualmente, não têm etiologia seguramente determinada. Recentes abordagens experimentais têm evidenciado a importância dos eventos que ocorrem durante a vida intrauterina como decisivos no surgimento destas doenças em diferentes momentos da vida pós-natal (Entringer et al., 2011; Fowden & Forhead, 2004; McMillen & Robinson, 2005; Pitale & Sahasrabuddhe, 2011). Nesse contexto, nos últimos anos tem havido um maior interesse em se estudar o desenvolvimento fetal, bem como o papel dos HTs durante a gestação, tanto para a mãe como para o feto (De Vivo et al., 2010). Como dito anteriormente, a gestação induz uma série de alterações fisiológicas que afetam a função tireoidiana, a fim de ajustar a liberação de HTs para o adequado desenvolvimento gestacional. As disfunções tireoidianas durante a gestação requerem considerações especiais, pois tanto o hipotireoidismo manifesto quanto o hipotireoidismo subclínico podem levar a complicações maternas e fetais (Maciel & Magalhães, 2008).

Fisiologicamente, já no início da gestação, os níveis elevados de estrógeno determinam aumento das concentrações séricas da proteína transportadora de T4, TBG,

particularmente por estímulo à sua síntese (Glinioer, 1997). Em consequência há aumento das concentrações séricas de T4 e T3 totais que atingem um *plateau* por volta de 12 a 14 semanas da gestação. Este aumento rápido e marcante da TBG (2 a 3 vezes do normal) é acompanhado por tendência à diminuição do T4 e do T3 livres e resulta em estímulo do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (Stricker et al., 2007; Vieira et al., 2004).

No primeiro trimestre da gestação, ocorre estimulação direta da tireoide materna pelas concentrações elevadas de gonadotrofina coriônica (hCG). Este aumento, que atinge valores de pico entre a 8^a e a 14^a semana de gestação, é acompanhado por inibição do eixo hipotálamo-hipófise e, em face da reatividade cruzada com o receptor de TSH, promove aumento temporário do T4 livre (Glinioer, 1997, 1993; Glinioer et al., 1993).

Na gestação ocorre um aumento da necessidade de secreção hormonal pela tireoide desde as primeiras semanas após a concepção. Há um aumento de 10% na glândula tireoide durante a gravidez em países sem deficiência de iodo e pode-se observar um aumento de 20 % a 40 % em áreas com deficiência de iodo (Stagnaro-Green et al., 2011). Há ainda aumento da produção de T4 e T3 em 50%. A necessidade diária de iodo aumenta cerca de 50% também (Stagnaro-Green et al., 2011). Nesse contexto, todas estas modificações que ocorrem durante o período gestacional visando o aumento dos HTs nesta fase evidenciam a importância destes para o desenvolvimento somático e manutenção da homeostase durante os períodos fetal e neonatal (Chung, 2014; Li et al., 2014).

Além disso, durante toda a gestação, ocorre modificação do metabolismo dos hormônios maternos por meio de sua desiodação pela placenta. Três enzimas catalisam a desiodação dos HTs nos tecidos humanos (Bianco et al., 2002; Larsen et al., 1981). A atividade da desiodase tipo 1 parece não ser modificada na gestação, enquanto a do tipo 2 é expressa na placenta, porquanto sua atividade representa mecanismo homeostático para manter a produção maior de T3 local, quando as concentrações de T4 maternas são reduzidas. A placenta contém grandes quantidades de desiodases tipo 3 que convertem T4 em T3 reverso (rT3) e T3 em T2. Esta alta atividade durante a vida fetal pode

explicar as concentrações baixas de T3 e altas de rT3, que são características do metabolismo dos HTs fetais.

Durante muito tempo se acreditou que a placenta era impermeável aos HTs, embora estudos iniciais com marcação radioativa destes hormônios sugerissem que alguma porcentagem de T3 e T4 atravessasse lentamente a barreira placentária (Jatin Patel et al., 2011; Roti et al., 1983). A baixa permeabilidade desta barreira para o HT foi inicialmente atribuída às propriedades físico-químicas de T3 e T4. No entanto, a descoberta de que a placenta contém abundantes desidases tipo 3, responsáveis por converter T4 em T3 reverso (biologicamente inativo), sugeriu que a desidatação intraplacentária pode desempenhar um papel importante para a disponibilidade de HTs para o feto (Roti et al., 1983). Corroborando com estes dados, Vulsma et al., (1989) demonstraram que fetos com agenesia da glândula ou defeitos completos de organificação, incapazes de produzir hormônios tireoidianos, apresentavam concentrações de T4 correspondentes a 30% dos níveis normais circulantes. Estes autores demonstraram que a transferência transplacentária continua até o nascimento.

Ademais, a identificação da presença de receptores de T3 no cérebro fetal por volta da décima semana (Morreale de Escobar et al., 2004) e a observação da primeira fase de rápido desenvolvimento cerebral no segundo trimestre, período no qual o suprimento de hormônios tireoidianos se faz principalmente às custas da passagem materna, sugerem que baixas concentrações maternas de T4 podem resultar em déficit neurológico irreversível na criança (Haddow et al., 1999; Pop et al., 1999; Smit et al., 2000). Existem evidências clínicas que até mesmo reduções leves nos níveis de HTs materno no início da gestação, podem levar ao desenvolvimento neuropsicológico inadequado, destacando, assim, a importância de quantidades adequadas de T4 materno para o desenvolvimento fetal normal (Herzmann & Torrens, 1999; Li et al., 2010; Pop et al., 2003, 1999).

Na última década, o conhecimento acerca da capacidade dos HTs maternos atravessarem a barreira placentária tem aumentado significativamente. Vários transportadores de membrana placentário para hormônios tireoidianos têm sido descritos (Loubière et al., 2010). Loubière et al., (2010) descreveram a ontogenia dos

transportadores dos hormônios tireoidianos MCT8, MCT10, LAT1, LAT2, OATP1A2 e OATP4A1 em uma grande série (n=110) de placentas humanas normais em toda a gestação. Assim o método quantitativo RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) revelou, neste estudo, que todos os RNAs que codificam estes transportadores de HTs estavam expressos na placenta humana a partir da 6ª semana de gestação e durante toda a gravidez. Em conclusão, este estudo demonstrou que transportadores para HTs estão presentes na placenta humana a partir do início do primeiro trimestre com diferentes padrões de expressão durante a gestação. Seus efeitos coordenados podem regular tanto a passagem transplacentária quanto o fornecimento de HTs para o trofoblasto, ambos essenciais para o desenvolvimento normal do feto e da placenta (Loubière et al., 2010).

Além disso, achados sugerem que a placenta tem um papel não só na captação, mas também no armazenamento de iodo como um meio possível de proteger o feto de inadequações na ingestão de iodo na dieta materna (Burns et al., 2011). Estudo desenvolvido por Burns et al., (2011) postulou que a biodisponibilidade de iodo placentário contribui significativamente para a proteção contra hipotireoidismo

É interessante ressaltar que a placenta parece ser incapaz de compensar o hipotireoidismo materno. No início da gravidez quando os níveis adequados de HTs fetal são cruciais para o desenvolvimento neurológico normal, os níveis de T4 que serão encontrados no cérebro fetal refletem os níveis de T4 maternos (Chan et al., 2009; Ferreira et al., 1988). Isto sugere a ausência de um mecanismo de feedback dos níveis de HT materno na transferência materno-fetal de HT (Chan et al., 2009; Ferreira et al., 1988). Assim, redução de hormônios tireoidianos maternos pode promover danos encefálicos importantes no feto. Desta forma, é possível notar que a placenta é responsável por regular a passagem dos HTs maternos para o feto através da interação complexa dos transportadores de membrana, enzimas e desiodases (Chan et al., 2009; Ferreira et al., 1988).

Todas estas modificações, em conjunto ou separadamente, podem resultar na elevação das concentrações séricas dos hormônios tireoidianos durante a gestação (Glinoer, 1997) e reduções significativas do TSH (Stagnaro-Green et al., 2011), gerando

a necessidade de se adotar valores de referências específicos para cada trimestre (Lazarus et al., 2014; Stagnaro-Green et al., 2011). Durante o período gestacional é de extrema importância o diagnóstico precoce do hipotireoidismo, uma vez que este pode trazer consequências para o conceito e para a própria gestante. Essa patologia está associada a um risco aumentado para complicações adversas na gravidez (Negro & Stagnaro-Green, 2014b), como baixo peso ao nascer, parto prematuro (Allan et al., 2000; Kumru et al., 2015; Sheehan et al., 2015; Stagnaro-Green, 2009), aborto, bem como efeitos prejudiciais sobre o desenvolvimento neurocognitivo fetal quando não tratada adequadamente (Benhadi et al., 2009).

Baseado em três *Guidelines* elaborados por um corpo de especialistas que compõem a Associação de Tireoide Americana (ATA) (Stagnaro-Green et al., 2011), a Sociedade de Europeia de Tireoide (TES) (Lazarus et al., 2014) e, a Sociedade Brasileira de Endocrinologia (SBEM) (Sgarbi et al., 2013), a avaliação laboratorial para classificação do hipotireoidismo declarado/clínico ou do hipotireoidismo subclínico (HSC) durante a gravidez se baseia nas dosagens dos hormônios TSH e T4 livre. E o diagnóstico destas patologias nas gestantes deve ser confirmado de acordo com os valores de referência específicos destes hormônios na gravidez. Assim, levando em consideração os novos parâmetros hormonais de normalidade adotados durante a gestação, o hipotireoidismo é definido como um TSH elevado ($> 2,5$ mIU/L para o primeiro trimestre e $>3,0$ mIU/L para o segundo e terceiro trimestres (Stagnaro-Green et al., 2011) ou $> 3,5$ mIU/L (no caso do Brasil) para o segundo e terceiro trimestre, respectivamente (Sgarbi et al., 2013), associado com uma concentração de T4 livre abaixo do limite de normalidade. Em mulheres com níveis de TSH de 10,0 mIU/L ou acima, independentemente dos níveis de T4 livre, são considerados hipotireoideas (Stagnaro-Green et al., 2011).

2.5.HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL E EFEITOS NA PROLE

Considerando a hipótese da origem fetal das doenças adultas, o ambiente intrauterino (devido à plasticidade característica do período do desenvolvimento) pode influenciar o binômio saúde-doença a longo-prazo. Neste sentido, a restrição do

crescimento intrauterino, devido a fatores placentários, maternos e genéticos, podem permanentemente alterar o estado endócrino-metabólico do feto (Kanaka-Gantenbein, 2010).

A hipótese sobre a origem fetal das doenças na vida adulta, foi inicialmente proposta pelo médico e epidemiologista David James Purslove Barker que realizou estudo nas cidades inglesas de Hertfordshire, Preston e Sheffield. Neste estudo foi demonstrado que a mortalidade por doença coronariana era duas vezes maior nos indivíduos que se localizavam no limite inferior da curva de distribuição do peso ao nascimento. Para explicar este fenômeno, o autor propôs o que hoje é denominado “Hipótese de Barker”. Segundo ele, períodos de rápida divisão celular ocorrem durante o desenvolvimento do feto, conhecido como períodos críticos, nos quais são formados os diversos órgãos e tecidos. Eventos ocorridos durante estes períodos podem alterar a estrutura e função dos sistemas em desenvolvimento gerando consequências precoces (i.e. alteração no peso ao nascimento) e/ou tardias (i.e. doenças na vida adulta) (Barker, 1996; Barker et al., 1989).

O conjunto dos estudos de Barker e de outros estudos geraram o conceito de plasticidade de desenvolvimento definido como um processo por meio do qual diferentes genótipos podem resultar na presença de um único fenótipo em resposta a estímulos ambientais durante a vida intrauterina. Esses estímulos têm implicações adicionais, considerando que seus efeitos podem ser transferidos e perpetuados entre gerações por meio de mecanismos epigenéticos (Drake & Walker, 2004).

A carência dos HTs materno determina uma insuficiência desses hormônios para o feto e isto pode determinar o aparecimento de diferentes condições patológicas na vida adulta (Chan & Rovet, 2003). Já foi demonstrado que os HTs são de fundamental importância para o desenvolvimento do cérebro na vida fetal e pós-natal (De Vivo et al., 2010; Setian, 2007). A produção dos HTs de maneira insuficiente ou devido a sua ação inadequada em nível celular ou molecular leva a hipoplasia dos neurônios corticais, atraso da mielinização e redução da vascularização. Assim, se a reposição hormonal não se fizer imediatamente após o nascimento, essas lesões podem tornar-se irreversíveis, com prejuízo para o desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) (Setian, 2007). Em

mamíferos, a deficiência de T3 resulta em retardo do crescimento, surdez, neurogênese prejudicada e malformações cardíacas congênitas (Li et al., 2014). E a deficiência de T4 ou elevados níveis de TSH na gestante, podem resultar em prejuízo cognitivo na prole (Kasatkina et al., 2006; Li et al., 2010).

Em estudos experimentais, prole de ratas com hipotireoidismo gestacional experimental (tratadas com agentes antitireóideos: PTU ou MTZ, do 10º dia de gestação até a 11ª semana pós-natal), mostraram retardo no desenvolvimento cerebral (Shibutani et al., 2009). Redução na área do corpo caloso e no número de oligodendrócitos no córtex cerebral foram vistas tanto no hipotireoidismo induzido por PTU quanto por MTZ (Shibutani et al., 2009).

O hipotireoidismo induzido por metimazol afeta os níveis séricos de TSH e a arquitetura histológica da glândula tireóide da prole (Ahmed et al., 2010). O hipotireoidismo materno induzido, do 1º dia de prenhez até a 3ª semana de lactação, diminui na prole a atividade da acetilcolinesterase (AChE) e aumenta de maneira concomitante o conteúdo de ácido gama-aminobutírico (GABA), com supressão de Na^+ -ATPase, K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase, Mg^{2+} -ATPase, no cérebro, cerebelo e bulbo (Ahmed et al., 2010). Assim o hipotireoidismo materno, induzido, promove efeitos inibitórios na excitabilidade e neurotransmissão sináptica nestas regiões encefálicas. Ademais foi observado, de maneira mais pronunciada na prole de mães hipotireóideas, que com a progressão da idade dos filhotes, os níveis de D1 foram reduzidos no cérebro, cerebelo e bulbo (Ahmed et al., 2010).

Sinha et al., (2008) demonstraram o papel indispensável do T4 materno no desenvolvimento do cérebro do feto. Estes autores demonstraram que a deficiência de HTs materno, durante o período gestacional precoce, provoca elevação prematura maciça na expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), e morte neuronal no neocórtex embrionário de ratos. Neste estudo, o hipotireoidismo materno foi induzido pela administração de metimazol na água de beber ratas fêmeas prenhas desde o 6º dia de gestação até a lactação. Estudo desenvolvido por Pathak et al., (2011) com ratas prenhas tratadas com MTZ, do 6º de gestação até o final da lactação ou eutanásia, identificou que níveis adequados de HTs maternos asseguram adequada citoarquitetura

fetal neocortical ressaltando, segundo os autores, a importância da reposição de tiroxina precocemente.

Ademais, estudo experimental com prole de mães expostas a agentes antitireoideanos, como PTU e MTZ, evidenciou a presença de atraso no desenvolvimento cerebral nesses animais, além de mostrar fortes evidências de que genes reconhecidamente regulados pelos HTs têm sua expressão alterada no cérebro fetal no início da gestação (Shibutani et al., 2009). Estes achados fortalecem a ideia de que genes do SNC fetal podem ser regulados diretamente pelos HTs maternos (Chan & Rovet, 2003).

Koromilas et al., (2015a) avaliaram a atividade das bombas $\text{Na}(+),\text{K}(+)\text{-ATPase}$ e $\text{Mg}(2+)\text{-ATPase}$ no hipotálamo, cerebelo e ponte da prole de mães exposta ao hipotireoidismo perinatal (PTU 0.05% na água de beber). Os resultados evidenciaram que o hipotireoidismo materno em períodos críticos do desenvolvimento da prole resulta em inibição hipotálamica, pontina e cerebelar de $\text{Na}(+),\text{K}(+)\text{-ATPase}$, o maior marcador da excitabilidade neuronal e produção de energia bem como um importante regulador da neurotransmissão de sistemas importantes. Foi observado que a inibição ocorre em regiões específicas, uma vez que não é detectada no homogenato de cérebro inteiro. Estes mesmos autores, em outro estudo, expuseram ratas no período gestacional e/ou de lactação ao hipotireoidismo e observaram redução da atividade da acetilcolinesterase no córtex frontal da prole de ratas tratadas no período exclusivamente gestacional. (Koromilas et al., 2015b). Estes achados confirmam estudos prévios do mesmo grupo (Koromilas et al., 2014).

Neste contexto, dados com humanos, demonstraram que bebês nascidos de mães cujo T4 livre era 10% abaixo do valor mínimo de normalidade em 12 semanas de gestação apresentaram mensurável alteração no desenvolvimento psicomotor aos dois anos de idade, quando comparados ao resto da população (Pop et al., 2003).

Além do sistema nervoso, sabe-se que existe uma íntima relação entre a glândula tireoide e coração. Disfunção da tireoide, incluindo a doença tireoidiana subclínica, tem efeitos significativos sobre a função cardiovascular (Ballı et al., 2016;

Danzi & Klein, 2014). Neste sentido, dados do nosso grupo evidenciaram que filhos de mães hipotireoideas, durante a gestação, apresentam hipertensão arterial na vida adulta (90 DPN) (Santos et al., 2012). Além disso, a literatura científica aponta para o fato de que o aparelho visual e reprodutor também pode ser afetado pelo hipotireoidismo materno. Estudo com ratas prenhas que foram expostas ao metimazol (0.02%) durante o período gestacional e de lactação (15 ° dia de gestação ao 21° de lactação) destacou que o hipotireoidismo durante o período de desenvolvimento da prole prejudicou o desempenho da detecção de sinal visual de ratos aos 90 DPN (Hasegawa and Wada, 2013). Acrescido a isto, estudo experimental com prole de mães expostas ao hipotireoidismo, foi observado uma redução do volume testicular na prole, indicando que os níveis HTs maternos são importantes para o adequado desenvolvimento gonadal (Kobayashi et al., 2014).

Os dados do sistema imune de Albornoz et al., (2013), revelaram que camundongos gestados em condição de hipotireoidismo materno e induzidos a encefalite autoimune na vida adulta, apresentaram maior escore da doença, quando comparados ao grupo controle (ratos gestados em condição de eutireoidismo materno e induzidos a encefalite na vida adulta), alta desmielinização na medula espinhal, maior infiltrado de células CD4(+) e CD8(+) na medula espinhal e aumento na morte de oligodendrócitos. Neste sentido, dados de Nieto et al., (2016) sugerem que o HGE altera a resposta imune e a fisiologia dos pulmões da prole de camundongas infectadas por *Streptococcus Pneumoniae*.

No rato, a maturação estrutural e funcional da elaboração de processos nociceptivos inicia no período pré-natal e continua no período pós-natal (Nandi & Fitzgerald, 2005). Desordens que afetem o desenvolvimento do sistema somatossensorial durante o período pré- e pós-natal podem determinar modificações do limiar de sensibilidade a dor e aos demais sinais sensoriais (Fitzgerald & Jennings, 1999). Neste contexto, referente a circuitaria nociceptiva, Alves et al., (2013) demonstraram que o hipotireoidismo experimental, exclusivamente no período gestacional, promove hipersensibilidade ao estímulo nocivo pela prole de diferentes idades (7, 14, 21, 30 e 60 DPN). Além disso, os autores relataram redução na *performance* motora (rotarod) em machos filhos de mães com hipotireoidismo.

No entanto, apesar dos dados da literatura evidenciarem os prejuízos do hipotireoidismo gestacional, para a mãe, no que tange o não adequado desenvolvimento gestacional, e para o feto, promovendo retardos cognitivos e funcionais e afetando os mais diversos órgão e sistemas, ainda não há consenso a respeito da dosagem dos HTs e TSH no período gestacional (Vila et al., 2014). A Associação Americana da Tireoide (Stagnaro-Green et al., 2011) e a Associação Americanos dos Endocrinologista Clínicos (AACE) (Garber et al., 2012) são defensores da triagem seletiva dos HTs nas gestantes, mas não do *screening* universal. O fato de haver um número reduzido de estudos visando avaliar as repercussões do hipotireoidismo materno para a prole e o efeito benéfico para mãe e filhos do tratamento com levotiroxina após o diagnóstico, contribui para a defesa de um *screening* seletivo em detrimento do *screening* universal. No Brasil, a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) (Sgarbi et al., 2013), em seu Guideline publicado em 2011, endossa as recomendações destas sociedades supracitadas e não são a favor do *screening* universal. A SBEM recomenda o *screening* para a função tireoidiana apenas em gestantes de alto risco para disfunção tireoidiana que inclui: 1) história de hipertireoidismo ou hipotireoidismo ou tireoidite pós-parto prévia; 2) passado de irradiação cervical; 3) bócio; 4) história familiar de doença tireoidiana; 5) anticorpos antitireoidianos positivos; 6) diabetes melittus tipo 1 ou outra doença autoimune; 7) história de abortos ou partos prematuros; 8) sintomas e sinais de disfunção tireoidiana incluindo anemia, elevação de colesterol e hiponatremia; 9) tratamento com amiodarona.

A base da controvérsia em torno de triagem universal dos HTs durante a gestação, reside na falta de consenso entre os Guidelines citados anteriormente e o guideline da Sociedade Americana de Endocrinologia (AES) (De Groot et al., 2012), uma vez que os membros da AES divergiram quanto a recomendação o *screening* (alguns membros desta sociedade recomendaram o *screening* universal, enquanto outros não). É importante ressaltar, que a maior parte das recomendação atuais suportam a estratégia de avaliação dos HTs tireoideanos em condições específicas (triagem seletiva). No entanto, já foi demonstrado que esta estratégia pode deixar de diagnosticar de 33 a 81% de mulheres gestantes com hipotireoidismo (Horacek et al., 2010; Jiskra et al., 2011; Vaidya et al., 2007; Wang et al., 2011; Yang et al., 2014). Nesse contexto,

atualmente, já pode ser notado que outras sociedades, como a Sociedade Espanhola de Endocrinologia e Nutrição (SEEN), já começaram a recomendar o *screening* universal da função tireoideana na gestante (Galofré Ferrater et al., 2009; Tortosa, 2011; Vila et al., 2012).

Assim, a triagem universal para a disfunção da tireoide tanto clínica quando subclínica, em gestantes, permanece controversa (De Groot et al., 2012). Estudos têm demonstrado as repercussões do hipotireoidismo subclínico materno para mãe e para os filhos, porém, para alguns especialistas da área, não existem evidências suficientes para demonstrar que o diagnóstico e o tratamento com a levotiroxina possa melhorar o resultado clínico para o feto e para as gestantes, dada a escassez de estudos de intervenção (Klubo-Gwiedzinska et al., 2011). Acredita-se, que a medida que mais dados sobre a eficácia do tratamento e triagem para disfunção da tireoide em gestantes estiverem disponíveis, as recomendações para a realização de um *screening* universal para esta população provavelmente vai se tornar um consenso entre as diversas sociedades, colégios e associações (Chang & Pearce, 2013).

Curiosamente, é importante destacar que, apesar da ausência de um consenso mundial sobre a realização de um *screening* universal ou seletivo dos HTs para a mulher grávida, recentemente Villagelin et al., 2016 realizaram uma pesquisa no Brasil, com a finalidade de se avaliar o manejo do hipotireoidismo gestacional pelos membros da SBEM. Após a análise dos dados, os autores observaram que 81% dos endocrinologistas fizeram a avaliação dos hormônios tireoidieanos em todas as pacientes gestantes, a maioria durante o período pré gestacional ou depois da primeira visita do prenatal. Desta forma, baseado nestes achados, é digno de nota, que a maioria dos médicos é a favor de um *screening* universal, baseado na conduta clínica dos mesmos, (Villagelin et al., 2016), muito embora o Guideline da SBEM recomende uma triagem seletiva.

Em suma, a ocorrência de hipotireoidismo materno durante a gestação apresenta grande potencial em gerar desordens transitórias ou definitivas ao longo da vida da prole. Neste contexto, há indícios de que o desenvolvimento de diversos órgãos e sistemas da circuitaria neuronal somatossensorial fetal é claramente dependente de HTs

de origem materna. Por isso, a deficiência destes hormônios durante a vida intrauterina pode ser a origem de doenças hiper ou hipoalгésicas crônicas, sem causa aparente, e que acometem indivíduos mais tardiamente em suas vidas.

2.6.CIRCUITARIA DE DOR

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como " uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano". É uma experiência sensorial evolutivamente conservada e que é fisiologicamente necessário para um organismo detectar e evitar lesões (Velázquez et al., 2007).

2.6.1.Nociceptores: os sensores das vias de dor

A sensibilidade somática consiste em um conjunto de submodalidades pressórica/táctil, térmica e proprioceptiva. Os receptores somáticos podem ser sensíveis a estimulações mecânicas, térmicas ou químicas. Embora a sensibilidade de um determinado receptor seja alta para apenas um tipo de estimulação, especificamente no caso da dor, existem receptores que são considerados polimodais, visto que podem responder a estímulos de naturezas distintas. As diferenças constitucionais na membrana do neurônio e as estruturas acessórias que os envolvem determinam a sua sensibilidade quanto à natureza e intensidade do estímulo que recebem. Assim, além das terminações nervosas livres na pele e nos folículos pilosos, existem terminações nervosas envolvidas por diversas estruturas. As informações aferentes são conduzidas até o SNC através de fibras periféricas primárias cujos corpos celulares formam gânglios próximos da raiz dorsal da medula espinhal.

Os termorreceptores são responsáveis pela detecção da temperatura e de suas variações. São constituídos por terminações nervosas livres indiferenciadas histologicamente mas que se diferenciam funcionalmente. Assim, alguns termorreceptores possuem maior sensibilidade térmica por temperaturas estáveis próximas a 25°C sendo que estes são sensíveis as perdas de temperatura e, por isso, são

chamados de receptores para o frio. Outros termorreceptores são sensíveis as elevações de temperatura com uma sensibilidade máxima por temperaturas estáveis entre 40°C e 45°C. São chamados receptores de calor que, como os receptores de frio, estão distribuídos por toda a superfície corporal. Estes receptores, diferentemente dos de frio que estão associados às fibras A δ , estão associados às fibras do tipo C. Outros receptores são sensíveis ao calor e ao frio e não geram sensações conscientes de calor ou de frio, mas sim são responsáveis por gerar sensações de dor. Estes receptores são ativados ao ultrapassar os 45°C ou ao reduzir a temperatura abaixo de 10°C.

A morfologia das terminações nervosas sensoriais nociceptivas é altamente conservada de animais roedores para os humanos (Andrew & Greenspan, 1999; Foulkes & Wood, 2008; Lewin & Moshourab, 2004; Raja et al., 1988). Os nociceptores cutâneos são um grupo extremamente heterogêneo de neurônios alojados nos gânglios sensoriais periféricos localizados fora do SNC. Os estímulos nocivos externos (na pele) podem ser conduzidos até metros de distância dos seus corpos celulares (Dubin & Patapoutian, 2010).

Microneurografia e preparações nervosas cutâneas em mamíferos (Zimmermann et al., 2009) e microneurografia combinados com medições psicofísicas em humanos (Le Bars et al., 2001; Namer & Handwerker, 2009; Schmelz, 2009) têm revelado a existência de classes distintas de nociceptores ativados por estímulos nocivos. Estímulos adequados incluem temperaturas extremas ($> 40-45^{\circ}\text{C}$ ou $< \sim 15^{\circ}\text{C}$), uma intensa pressão, produtos químicos e sinalização de dano tecidual real ou potencial.

Nociceptores são geralmente eletricamente silenciosos (Woolf & Ma, 2007) e transmitem, todo ou nenhum, potencial de ação apenas quando estimulados. No entanto, a atividade do nociceptor *per se* não leva à percepção da dor. Isto exige que informações da periferia alcancem os centros superiores e, normalmente, depende da frequência dos potenciais de ação nos neurônios aferentes primários, da somação temporal pré e pós sinápticas e das influências centrais (Dubin & Patapoutian, 2010).

2.6.2. Transmissão da dor

A velocidade de transmissão é diretamente correlacionado com o diâmetro dos axônios dos neurônios sensoriais e se eles estão ou não mielinizados . A maioria dos nociceptores têm um diâmetro pequeno (0,4-1,2 μm de diâmetro) e axônios sem mielina (fibras-C) (Woolf & Ma, 2007) agrupados em fascículos rodeadas por células de Schwann e velocidade de condução de 0,4-1,4 m / s (Djouhri & Lawson, 2004). A dor de aparecimento rápido inicial (dor primária) é mediada por nociceptores de fibra A, cujos axônios são mielinizados e possuem velocidade de condução de aproximadamente 5-30 m / s (Djouhri & Lawson, 2004) . As fibras mielinizadas de médio calibre A δ (2-6 μm), conduzem o impulso nervoso com maior velocidade (12-30 m/s) e as fibras C assim como as fibras mielinizadas de grande diâmetro tipo A β (>10 μm) que são capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso (30-100 m/s) (Besson, 1999; Millan, 2002) (figura 29).

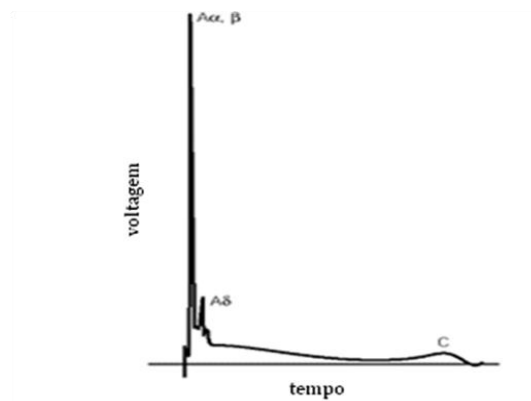


Figura 29. Potenciais de ação gerados pelos diferentes tipos de fibras

Mais especificamente os nociceptores térmicos são ativados por temperaturas extremas ($> 45^{\circ}\text{C}$ ou $< 10^{\circ}\text{C}$) e inervados por fibras mielinizadas finas do tipo A δ . Nociceptores polimodais são ativados por alta intensidade de estímulo mecânico, químico ou térmico (quente e frio). Esses nociceptores têm pequeno diâmetro e são inervados por fibras não mielinizadas e de condução nervosa lenta do tipo C.

A maioria destas fibras citadas anteriormente, se originam de neurônios cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios das raízes medulares dorsais, fazem

sinapse com neurônios secundários do corno dorsal da medula, onde os neurotransmissores são sintetizados e liberados. Os neurônios secundários do corno dorsal da medula dão origem as vias ascendentes de dor (ipsilateral) que são responsáveis pela transmissão do impulso para as regiões supra espinhais.

De modo geral, após a exposição da pele a um estímulo nocivo, fibras mielinizadas do tipo A δ provocam uma fase rápida, de dor primária, aguda de natureza “cortante”, enquanto que as fibras amielinizadas do tipo C evocam uma segunda fase de dor denominada “maçante”, sendo esta crônica (Millan, 1999).

A substância cinzenta da medula espinal pode ser dividida em 10 lâminas, com base na sua citoarquitetura ou com base nas características citológicas dos neurônios residentes. Destas 6 compõem o corno dorsal da medula espinal, são elas: a lâmina I (camada marginal), lâmina II (substância gelatinosa), Lâmina III e IV (núcleo proprius) e V e VI (camadas profundas) (Millan, 1999). A lâmina VII corresponde à massa cinzenta intermediária, as lâminas VIII e IX compõem o corno ventro-medial e o corno ventro-lateral, respectivamente, enquanto a lâmina X é a região em torno do canal (Millan, 1999). As duas lâminas mais superficiais I e II (a parte mais externa da lâmina II), juntamente com as lâminas V, VI e X constituem as regiões predominantemente implicadas na recepção, processamento e transmissão das informações nociceptivas. Assim, classes de neurônios aferentes primários, que conduzem informações distintas terminam em lâminas diferentes do corno dorsal da medula espinal. Há uma estreita correspondência entre a organização anatômica e funcional dos neurônios no corno dorsal da medula espinal.

As fibras aferentes do tipo A δ e C são responsáveis por enviar a informação do estímulo nocivo a partir do tecido injuriado até principalmente as lâminas superficiais (I, camada marginal e II, substância gelatinosa) do corno dorsal da medula espinal. Sendo que as fibras tipo C projetam-se predominantemente para a lâmina II (IIo) e as fibras A δ para a lâmina I. As fibras A β são responsáveis por levar informações referentes aos estímulos mecânicos não nocivos para as lâminas III, IV (nucleos proprius) e V (camada profunda) do corno dorsal da medula espinal. Sendo que as lâminas III e V também recebem informações da fibra do tipo A δ .

Os neurônios, cujos corpos celulares estão localizados no gânglio dorsal da medula espinhal, fazem sinapse com neurônios de segunda ordem localizados no corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios de segunda ordem ascendem via medula espinhal projetando suas fibras, principalmente para o tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios para o córtex somatosensorial, onde a somatização do estímulo nocivo acontece, ou emitem projeções ao giro cingulado anterior, responsável pelo componente emocional da dor. Esta constitui a via clássica da dor, porém existem outras vias e estruturas nervosas envolvidas neste processo (Russo and & Brose, 1998).

A informação referente à lesão tecidual ascende a partir da medula espinhal até o cérebro via sistema ântero-lateral através de cinco grandes vias ascendentes: 1. Espinotalâmico; 2. espinoreticular; 3. tratos espinomesencefálicos; 4. cervicotalâmico; e 5. Espinohipotalâmico. As principais vias ascendentes nociceptivas são as vias espinotalâmicas ventrais e dorsais. As ventrais constituem os tratos neoespinotalâmico e cervicoespinotalâmico, que terminam nos núcleos talâmicos, principalmente os núcleos ventrocaudais de onde partem axônios para o córtex somestésico. Estas vias são responsáveis pelo aspecto sensitivo-discriminativo da dor. Já as vias do grupo espinotalâmico dorsal incluem os tratos paleoespinotalâmico e paleotrigemitalâmico que emitem suas projeções até os núcleos mediais e intralaminares do tálamo, bem como incluem os tratos espinoreticular e espinomesencefálico. As vias espinotalâmicas dorsais fazem sinapse com tálamo. O trato espinoreticular faz sinapse com os neurônios da formação reticular do tronco cerebral e o trato espinomesencefálico faz sinapse com os neurônios da substância cinzenta periaquedutal (PAG) e núcleo parabraquial (PBN). Sendo que acredita-se que o trato espinoanular, componente do trato mesencefálico, é o que de fato se projeta para o PAG (Millan, 1999). Da PAG ventral partem também as vias reticulotalâmicas que constituem projeções para regiões diversas do sistema límbico (Millan, 2002, 1999). Esses axônios projetam-se para o lado contralateral da medula espinhal e ascendem na matéria branca ântero-lateral, terminando no tálamo. Ademais o núcleo parabraquial (PBN) também recebe os tratos espinobraquioamigdalóide e o espinobraquihipotalâmico (ambos originam-se das lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal).

O trato espinorreticular compreende os axônios dos neurônios nas lâminas VII e VIII. Esta via ascende no quadrante ântero-lateral da medula espinhal e terminam na formação reticular e no tálamo. Em contraste com o trato espinotalâmico, muitos dos axônios do trato espinorreticular não cruzam a linha média. O trato espinomesencefálico compreende os axônios dos neurônios nas lâminas I e V. Esta via projeta-se para o quadrante ântero-lateral da medula espinhal, para a formação reticular mesencefálica e substância cinzenta periaquedutal, e através do trato espinoparabraquial, se projeta para os núcleos parabraquiais. Por sua vez, os neurônios dos núcleos parabraquiais enviam projeções para a amígdala, um componente importante do sistema límbico, envolvido com o comportamento emocional da dor. Assim, é sugerido que o trato espinomesencefálico contribui com componente afetivo da dor.

O trato cervicotalâmico ascende a partir dos neurônios do núcleo cervical lateral, localizada na substância branca lateral, acima de dois segmentos cervicais da medula espinhal. O núcleo cervical lateral recebe entrada de neurônios nociceptivos nas lâminas III e IV do cordão espinhal. A maioria dos axônios cervicotalâmicos cruzam a linha média e ascendem para os núcleos no mesencéfalo e os núcleos ventro-posteriores laterais e pósteromediais do tálamo. Alguns axônios das lâminas III e IV projetam-se através das colunas dorsais da medula espinhal (em conjunto com os axônios de grande diâmetro mielinizadas, fibras aferentes primárias) e terminam nos núcleos grácil e cuneiforme da medula. O trato espinohipotalâmico compreende os axônios dos neurônios nas lâminas I, V e VIII. Esta via se projeta diretamente para os centros de controle autonômico supra-espinhais e é sugerido que esta seja a via responsável por ativar complexas respostas neuroendócrinas e cardiovasculares.

Vários núcleos talâmicos são responsáveis por processar informações nociceptivas. No interior da lâmina medular interna, separando a massa talâmica lateral da medial, existem pequenas massas de substância cinzenta que constituem os núcleos intralaminares do tálamo. Medialmente à lâmina medular interna ficam os grupos medial e mediano (ou núcleos da linha média) e lateralmente os núcleos laterais. Lateralmente e posteriormente a medula interna situam-se os núcleos posteriores (Jones & Gebhart, 1986a). O grupo nuclear lateral do tálamo compreende o núcleo ventro-posterior medial e o núcleo posterior. Sendo importante salientar que o complexo de

núcleos talâmicos posterior incorpora o oralis pulvinar, o núcleo posterior e o núcleo posteriolateral. Esta região é um local importante para a integração do *input* nociceptivo e termossensorial, e sua desregulação funcional tem sido implicado na dor talâmica (Millan, 1999).

O tálamo tem sido considerado como a estrutura chave para o recebimento supra-espinhal, integração e transferência de informação nociceptiva. No entanto o tálamo não é apenas alvo do trato espinotalâmico ventral, mas também, direta e indiretamente, é alvo de outras vias que carregam informações nociceptivas. Na verdade, o tálamo codifica a informação sobre o tipo, padrão temporal, a intensidade de entrada cutânea e a localização topográfica da dor. Além disso, articula com as estruturas corticais e límbico responsável pela dimensão tanto o sensorio-discriminativo e emocionais da dor. O tálamo também desempenha um papel ativo e adaptável no processamento de informação nociceptiva (Millan, 1999).

Até recentemente a maioria das pesquisas sobre o processamento central da dor se concentravam no tálamo. No entanto, hoje se sabe que neurônios em várias regiões do córtex cerebral respondem seletivamente a entrada nociceptiva. Alguns desses neurônios estão localizados no córtex somatossensorial e tem pequenos campos receptivos (Millan, 1999).

Regiões tais como o córtex cingulado anterior (ACC) e o núcleo parabraquial (PBN) são regiões importantes para a entrada de informação nociceptiva. O ACC tem sido apontado como uma estrutura fundamental no componente afetivo da dor. Através de tomografia por emissão de pósitrons (PET) em seres humanos foi possível observar que duas outras regiões do córtex, o giro cingulado e o córtex insular, estão envolvidos na resposta à nocicepção. O giro do cingulado anterior compõe o sistema límbico e foi sugerido que este possa estar envolvido no processamento do componente emocional da dor. O córtex insular recebe projeções diretas dos núcleos mediais do tálamo e dos núcleos ventro-posteriores do tálamo (Ploghaus et al., 1999; Rainville et al., 1999; Tölle et al., 1999). Clinicamente, a ablação cirúrgica do tecido cortical do ACC e arredores, diminui a sensação desagradável de dor, sem afetar a habilidade do paciente para discriminar a intensidade ou a localização do estímulo nocivo (F.-L. Chen et al.,

2012). Acredita-se que o córtex insular pode, portanto, integrar os componentes afetivos, sensoriais e cognitivos, componentes responsáveis para a resposta dolorosa normal. O PBN constitui também um alvo central importante para as informações ascendentes nociceptivas da medula espinhal (Hylden et al., 1989a, 1989b; Klop et al., 2005). Resultados publicados por Coizet et al., 2010 demonstraram que a inatividade do PBN atenua e em alguns casos elimina respostas nociceptivas.

Ademais, outras regiões do SNC podem ser acessadas diretamente por neurônios espinhais nociceptivos tais como: a amígdala, o globo pálido / putamen (estriado de ratos e núcleo lenticular no homem), núcleo accumbens e septo, bem como o frontal, orbital (cíngulo) e o córtex infralímbico. Determinados alvos límbico das informações ascendente nociceptivas estão intimamente interligados através do trato com o hipotálamo, outra região importante para o processamento das informações dolorosas (Millan, 1999).

A transmissão química da dor através das vias aferentes depende da liberação de neurotransmissores tais como: acetilcolina (ACh), aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), histamina, óxido nítrico (NO), prostaglandinas e peptídeos sensoriais, tais como a substância P. Transmissão sináptica entre os nociceptores e neurônios do corno dorsal é mediada por neurotransmissores químicos liberados do centro de terminações nervosas sensoriais.

O aminoácido excitatório glutamato, não é apenas a classe principal de neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, mas também é liberado por fibras aferentes primárias. O principal neurotransmissor excitatório liberado pelas fibras A δ e C é o aminoácido glutamato. A liberação de glutamato a partir de terminais sensoriais evoca potenciais sinápticos rápidos nos neurônios do corno dorsal, ativando os receptores de glutamato tipo ácido- α -amino-2,3,-dihidro-5-metil-3-oxo-4-isoxazolepropionico (AMPA) e receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) (Besson, 1999), Ademais, estudos eletrofisiológicos sugerem que o glutamato (além de outros aminoácidos excitatórios) através da ação em ambos os receptores, ionotrópicos e metabotrópicos, estão envolvidos na transferência de informação nociceptiva do trato

espinotalâmico para o tálamo e do trato espinomesencefálico para a PAG (Besson, 1999).

2.6.3.Modulação da dor

Vias descendentes originárias do tronco cerebral e de outras estruturas cerebrais têm papel importante na modulação e integração de mensagens nociceptiva no corno dorsal da medula espinal (Millan, 1999). Estudos científicos mostraram que o cérebro tem circuitos modulatórios cuja principal função é regular a percepção da dor. Sistemas modulatórios diversos dentro do SNC afetam as respostas a estímulos nocivos. O sítio inicial da modulação encontra-se na medula espinhal, onde as interconexões entre vias aferentes nociceptivas e não-nociceptivas podem controlar a transmissão da informação nociceptiva para centros superiores no cérebro. Sistemas modulatórios diversos, dentro do sistema nervoso central, também alteram/atenuam as respostas a estímulos nocivos. Este controle pode ser originado no córtex, tálamo ou no tronco encefálico, sendo que os núcleos encefálicos, mais importantes, envolvidos com este controle são a PAG, núcleos da rafe e o locus ceruleus (LC).

A dor não é apenas um produto direto da atividade de fibras aferentes nociceptivos. Esta é regulada pela atividade de outras fibras aferentes mielinizados que não estão diretamente envolvidas com a transmissão da informação nociceptiva. A teoria dos portões ou teoria das comportas foi formulada por Melzack e Wall (1965) e esta descreve a dor como resultado da atividade de fibras aferentes nociceptivos e não-nociceptivas. Esta teoria incorpora diversas observações importantes tais como: 1.os neurônios da lâmina V, e, possivelmente, lâmina I, recebem entradas excitatórias convergentes das fibras A β (não-nociceptivas) e das fibras A δ e C (nociceptivas); 2. as fibras de grande diâmetro A β inibem o disparo de neurônios da lamina V, do corno dorsal da medula espinhal, ativando interneurônios inibitórios na lâmina II; e 3.as fibras A δ e C excitam os neurônios da lâmina V, mas também inibem o disparo dos interneurônios inibitórios na lâmina II, que são ativadas pelas fibras A β (Melzack & Wall, 1965) (figura 30).

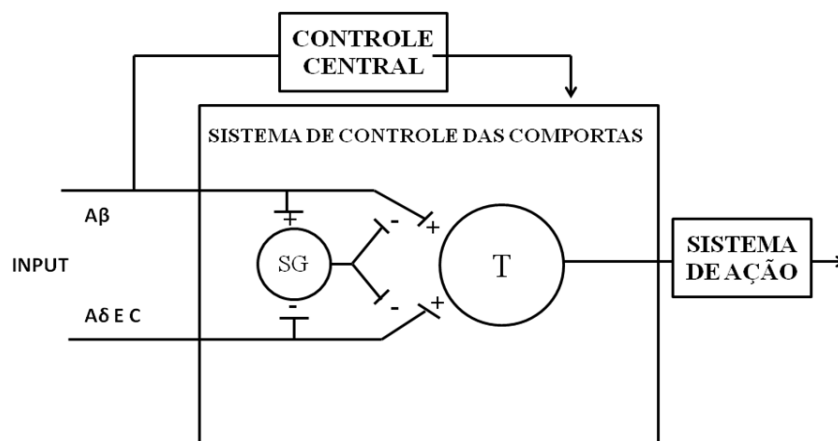


Figura 30. Diagrama sistemático de controle da dor via teoria das comportas. SG (substância gelatinosa); T (neurônio de transmissão) (Melzack & Wall, 1965).

Este modelo falhou em explicar todos os dados experimentais. Além disso, as novas descobertas contradizem parcialmente alguns dos seus componentes (Calvino & Grilo, 2006). À luz de novos dados, Wall modificou o modelo assumindo a existência de duas famílias de interneurônios (Wall, 1978) (Figura 31). Sendo ambas as famílias controladas por influências descendentes vindas de estruturas supra-espinal.

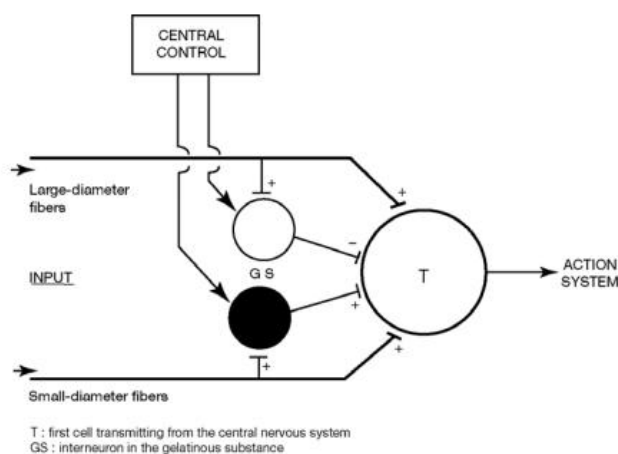


Figura 31. Teoria das comportas revisada. Sistemas de controle da dor envolve duas famílias de interneurônio e não somente uma (Calvino & Grilo, 2006).

Assim, como pôde ser observado, já na década de sessenta estudos estabeleceram que vias descendentes encontravam-se tonicamente ativas, vias estas descritas como inibitórias visto que após transsecção da medula espinhal os reflexos

nociceptivos foram exageradas (Gebhart, 2004). O estímulo à investigação desta circuitaria descendente de modulação da dor veio através do trabalho de Reynolds, 1969, que demonstrou que a estimulação elétrica focal no mesencéfalo, em ratos, mais precisamente a estimulação da PAG permitiu a cirurgia abdominal na ausência de anestesia geral. Este bloqueio ocorre porque a estimulação desta região é responsável por recrutar vias neurais descendentes que inibe a atividade dos neurônios nociceptivos da medula espinhal. A substância cinzenta periaquedutal também inibe o disparo de neurônios nociceptivos nas lâminas I e V, reduzindo o processo algico.

A partir deste primeiro relato, o conceito de sistemas endógenos envolvidos na modulação da dor evoluiu. E como consequência dos estudos de Reynolds (1969), o PAG ventrolateral foi rapidamente estabelecida como uma importante área para inibição descendente e para o processamento nociceptivo espinal (Reynolds, 1969). Além disto, esta região foi descrita também por Yaksh e Rudy (1978) como um sítio importante de ação dos opióides, após microinjeção direta, visto que o efeito da estimulação elétrica era replicado (Yaksh & Rudy, 1978). Com o avançar das pesquisas também ficou claro que a estimulação elétrica em diferentes locais no cérebro, incluindo o córtex sensorial, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, ponte e bulbo, de forma semelhante, foi responsável por produzir efeitos inibitórios sobre o processamento nociceptivo espinal.

Como consequência destes estudos envolvendo estímulos eletrofisiológicos, estudos anatômicos e farmacológicos sobre as vias descendente de modulação da dor foram realizados, sendo assim determinado a influência destas vias sobre o processamento nociceptivo espinal. Especificamente, a influência do bulbo rostroventral (RVM), incluindo o núcleo magno da rafe medial (Gebhart, 2004).

Vias descendentes do PAG através do RVM para o corno dorsal da medula espinhal, constitui um importante mecanismo de modulação ascendente transmissão nociceptiva espinal e outro nível potencial de modulação da dor e analgesia (Velázquez et al., 2007).

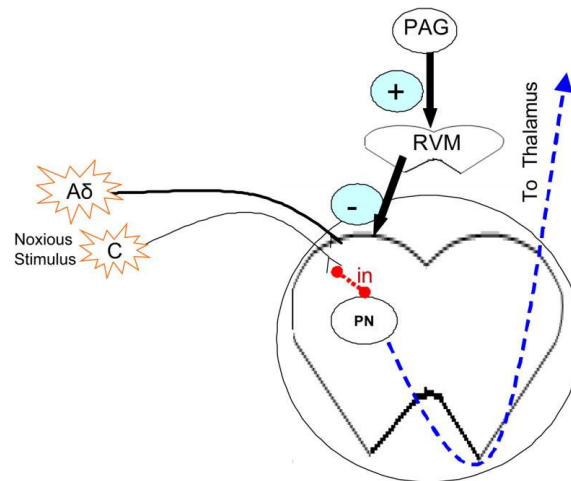


Figura 32. Um estímulo nocivo vai excitar nociceptores periféricos (fibras delta e C). Estas fibras fazem sinapse com neurônios do corno dorsal segunda ordem. Alguns desses neurônios do corno dorsal são interneurônios excitatórios ou inibitórios. Outros são neurônios ascendente de projeção espinotalâmico (PN) que sobem através do funículo ventrolateral contralateral para transmitir a sensação de dor para o cérebro. Neurônios do corno dorsal também estão sujeitos a descendente de modulação do cinza periaqueductal mesencéfalo (PAG) através de circuitos polisinápticas através da medula, incluindo através da medula ventromedial rostral (RVM) (Velázquez et al., 2007).

Influências descendente inibidoras do tronco cerebral são originadas principalmente a partir da PAG no mesencéfalo e do bulbo ventromedial rostral (RVM), que compreende o núcleo magno da rafe (NMR) e o núcleos paragigantocelular pars alfa (Calvino & Grilo, 2006) . A estimulação dos neurônios nestas estruturas, produz analgesia que é relacionada aos efeitos inibitórios promovida pelos tratos serotoninérgicos descendente, nos neurônios nociceptivos espinhais, resultando em bloqueio da transmissão dos sinais nociceptivos.

O neurotransmissor serotonina, desempenha um papel importante na modulação da transmissão nociceptiva. A maioria das evidências indicam que a medula espinal é o principal sítio de ação da 5-HT e esta é liberada a partir de fibras descendentes provenientes do RVM. O papel da 5-HT na modulação da dor já se encontra muito bem descrito. Estudo evidenciou que o paraclorofenilalanina (*pCPA*), bloqueador da síntese de 5-HT, é responsável por abolir a analgesia induzida por estimulação elétrica no SNC (Basbaum, 1981).

Os núcleos da rafe, produtores de serotonina, se subdividem de vários grupamentos ao longo do mesencefalo, ponte e bulbo, dentre os quais o núcleo dorsal da rafe (NDR) e núcleo magno da rafe (NMR), estão envolvidos com o controle

descendente da dor (Stamford, 1995). O NMR recebe *input* diretamente do PAG e essa conexão evoca analgesia. Já foi demonstrado, em estudo prévio, que a estimulação elétrica do NMR reduz a resposta das células do corno dorsal para calor nocivo (Oliveras et al., 1975). O NDR se situa próximo a substância cinzenta periaquedutal, mas é funcionalmente uma região distinta desta. É sabido que a estimulação elétrica do NDR promove analgesia. Tem sido sugerido que o NDR pode ser o mais efetivo núcleo para iniciar a estimulação analgésica (Oliveras et al., 1979; Stamford, 1995). Este consiste no mais importante núcleo serotoninérgico do encéfalo. O papel da serotonina (5-HT) nas vias descendentes de controle da dor é largamente estudado. Assim, já foi observado em estudos prévios que paraclorofenilalanina promove inibição na síntese de serotonina no NDR e assim abole a analgesia induzida por estimulação central (Stamford, 1995).

Os axônios dos neurônios serotoninérgicos no RVM (mais notavelmente no NMR) se projetam, em cada segmento da coluna vertebral, diretamente no corno dorsal da medula espinal. Com base nestes dados e no fato de que a formação reticular no bulbo e a PAG (duas estações de retransmissão na transmissão de sinais nociceptivos) se projetam para o RVM, PAG e NRM têm sido envolvidos no feedback negativo bulbo-medula espinal (Basbaum & Fields, 1984).

Porém, apesar do já reconhecido papel da serotonina na circuitaria nociceptiva, a compreensão da neurotransmissão serotoninérgica é dificultada, uma vez que o corno dorsal da medula espinal possui anatomia complexa (Ossipov et al., 2010) e que existem sete classes de receptores para este neurotransmissor (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇, sendo estes ainda subdivididos em 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}) (Zifa & Fillion, 1992). Estes dois fatores complicam a interpretação do papel da serotonina na modulação da dor.

Dentre os subtipos de receptores de serotonina, estudo desenvolvido por Alhaider & Wilcox, 1993 investigou o efeito modulatório espinal do receptor de serotonina tipo 5-HT₁ na nocicepção em ratos. Para tanto foi utilizados conhecidos agonistas do receptor 5-HT_{1A} [8-Hydroxy-2-di-n-propylamine, a tetraílin (8-OH-

DPAT) e a bupiriona], agonistas do receptor tipo 5-HT_{1B} [m-trifluoromethylphenyl-piperazina (TFMPP) e 7-trifluoromethyl-4-(4-metil-1-piraziny)-pyrrolo (1,2-la) quinoxaline (CGS 12066B)] bem como um agonista misto de receptor tipo 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} [5-carboxamidotryptamine (5-CT)]. Assim, foi constatado que a administração intratecal de 8-OH-DPAT, bupiriona e 5-CT facilitou significativamente o reflexo de retirada da cauda, durante o teste de tail-flick, enquanto as drogas TFMPP e CGS 12066B foram responsáveis por prolongar o tempo de latência ao tail-flick. Estes resultados confirmam outros achados sobre o papel facilitatório do receptor 5-HT_{1A} sobre as respostas nociceptivas e apoia o envolvimento do receptor 5-HT_{1B} na ação antinociceptiva da serotonina.

Neste sentido, hoje já se sabe que o efeito da serotonina espinal pode ser inibitória ou facilitatória, dependendo do subtipo de receptor ativado (Dogrul et al., 2009; Green et al., 2000; Rahman et al., 2009; Sasaki et al., 2006; Suzuki et al., 2004). A administração espinal de um antagonista do receptor inibitório 5-HT₇ bloqueou o efeito antinociceptivo da morfina microinjectado no RVM e o antagonismo farmacológico do receptor facilitatório 5-HT₃ bloqueou a hiperalgesia induzida por colecistocinina administradas na RVM (Dogrul et al., 2009). Além disso, a administração sistêmica de agonistas 5-HT₇ bloqueou a hiperalgesia induzida por capsaicina em ratos, enquanto o antagonista de 5-HT₇ gerou hipersensibilidade mecânica (Brenchat et al., 2009). É importante destacar que o receptor 5-HT₇ foi identificado no gânglio da raiz dorsal e nos terminais centrais de fibras aferentes primárias (Doly et al., 2005; Pierce et al., 1996) bem como, em interneurônios GABAérgicos no corno dorsal da medula espinal (Doly et al., 2005). A localização destes receptores é consistente com o seu papel na modulação da dor (Brenchat et al., 2009). Embora estes achados indiquem um papel importante da modulação serotoninérgica na dor, os mecanismos espinais precisos ainda permanecem obscuros.

Acrescido a isto, existem fortes evidências relacionando a noradrenalina (NA), um dos neurotransmissores mais abundantes no cérebro, não apenas com a analgesia induzida por estimulação central, mas sugerindo também que os efeitos da NA são mediados por vias descendentes. Sagen & Proudfit, 1984 demonstraram que a lesão espinal induzida pela neurotoxina 6-hydroxydopamine (6-OHDA) promove redução

drástica do conteúdo de NA promovendo hiperalgesia. Além disso já foi demonstrado por Reddy e Yaksh (1980) que a administração intratecal de NA promove analgesia em ratos. Segundo os autores, isto parece ser mediado por receptor α -adrenérgico, visto que o efeito antinociceptivo da NA foi antagonizado pela administração sistêmica prévia ou intratecal de fentolamina (α -bloqueador), mas não foi afetado pelo pré-tratamento com propranolol (β -bloqueador) (Reddy & Yaksh, 1980).

Na região supra-espinhal, a NA também regula antinocicepção através de sua ação sobre α -adrenoceptores localizados em núcleos cerebrais e na medula espinhal. É sabido que um número de regiões do cérebro recebem inervação noradrenérgica e expressam RNAm para alfa-adrenoceptor. Estas estruturas cerebrais incluem o RVM, núcleo reticular lateral bulbar, amígdala, LC, hipotálamo, entre outras (Zhang et al., 2010).

Outra via descendente inibitória que bloqueia a atividade dos neurônios nociceptivos no corno dorsal tem origem no LC noradrenérgico e em outros núcleos do bulbo e da ponte. Essas projeções descendentes bloqueiam, direta e indiretamente, a saída de neurônios nas lâminas I e V por ações inibitórias. O LC, composto por 6 subnúcleos, está localizado na ponte dorsolateral e estudos demonstraram que esta região envia projeções noradrenérgicas para a medula espinhal por meio das vias descendentes (Clark & Proudfit, 1991; Jones & Gebhart, 1986a; Kayser & Guilbaud, 1987). Ativação do LC eletricamente ou quimicamente pode produzir antinocicepção profunda (Tsuruoka & Willis, 1996a; Wei et al., 1999) e pode inibir a atividade nociceptiva em neurônios do corno dorsal (Clark & Proudfit, 1992, 1991; Craig, 1995; Zimmermann, 1983). A ativação da via descendente do LC para a medula espinhal ocorre durante a inflamação periférica e isto diminui o desenvolvimento de hiperalgesia (Tsuruoka & Willis, 1996b). Neste sentido, estudos tem evidenciado que o LC envia uma projeção bilateral para o corno dorsal da medula espinhal (Clark & Proudfit, 1991; Jones and Gebhart, 1986b; Sluka & Westlund, 1992). Assim, axônios dos neurônios contralaterais provenientes das projeções do LC, cruzam a linha média dentro do cérebro e descendem através do funículo dorsolateral (DLF) para terminar no corno dorsal da medula espinhal (Jones & Gebhart, 1986b; Pertovaara, 2006; Sluka &

Westlund, 1992). Este achado sugere que a via descendente proveniente do LC, deve ser ativada bilateralmente durante a inflamação.

Estudos identificaram que todos os três subtipos de receptores α (1A , 1B , 1D) estão presentes no gânglio da raiz dorsal (Nicholson et al., 2005; Xie et al., 2001) e que existem receptores $\alpha 2$ noradrenérgico nas lâminas do corno dorsal (Shi et al., 2000). Estes receptores são normalmente ativado pela noradrenalina liberada pela ativação das vias descendentes noradrenérgicas inibitórias. Isto proporciona uma explicação para os efeitos analgésicos dos agonistas de $\alpha 2$ noradrenérgicos (Pertovaara, 2006).

À nível de medula espinhal, parece que a modulação da sinapse entre neurônios de primeira e segunda ordem também pode envolver além das encefalinas, outros neurotransmissores tais como dopamina e GABA (Sorkin & Wallace, 1999). A modulação da dor através de fibras eferentes depende da liberação de neurotransmissores que contribuem alterando o limiar doloroso, tais como: a noradrenalina, dopamina e serotonina que atuam em receptores específicos e ainda opioides endógenos como algumas encefalina e endorfinas (Millan, 1999; Mogil & Grisel, 1998).

Estudo desenvolvido por Todd & Millar, (1983) observaram que a 5-HT também estimula interneurônios GABAérgicos o que, por sua vez, auxiliaria na redução da dor. Isto ocorre, visto que o GABA também constitui um aminoácido inibitório. Trata-se do neurotransmissor mais amplamente distribuído no sistema nervoso. Aproximadamente 40% das terminações nervosas no PAG são GABAérgicas. Atua primariamente na redução da excitabilidade neuronal através da ligação a receptores GABA (GABAA, GABAB e GABAC), os quais promovem a abertura de canais de Cl^- ou de K^+ na membrana do nervo destes receptores. O influxo de Cl^- ou o efluxo de K^+ na célula pós-sináptica hiperpolariza a membrana celular, reduzindo a propagação do potencial de ação, e assim, inibindo a transmissão nociceptiva.

2.6.4. Influências descendentes facilitatórias

Até a década de 1990, o foco da investigação estava voltada para as vias descendentes responsáveis pela inibição do processamento nociceptivo espinal no RVM. Porém, contrariamente, estudos demonstraram a presença de vias descendentes facilitatórias provenientes do RVM que eram responsáveis pelo estado de hiperalgesia após lesão do tecido periférico (Gebhart, 2004). Influências facilitatórias descendentes nociceptivas do tronco cerebral têm sido descritas. Elas exacerbam os efeitos da estimulação nociceptiva ao nível da medula espinhal (Calvino & Grilo, 2006). A estimulação de alta intensidade da RVM produz efeitos analgésicos (ver acima), enquanto que a estimulação da mesma região com intensidades 4-10 vezes inferior tem um efeito facilitador sobre a produção de dor (Gebhart, 2004; Zhuo & Gebhart, 1997, 1990). A maioria das informações disponíveis sobre as células RVM foram obtidas por Fields em estudos com ratos (Fields, 1992). Três famílias de células foram diferenciadas com base nas respostas a estimulação nociceptiva térmica da cauda de ratos: células ON, cuja atividade aumentam imediatamente antes do reflexo de retirada da cauda desencadeado pelo estímulo nociceptivo, células OFF cuja atividade tônica era interrompida imediatamente antes do reflexo de retirada da cauda, e as células neutras que não responderam a estímulos nociceptivos. A função das células neutras não é clara, mas esses neurônios podem representar um subtipo de células ON ou OFF (Ellrich et al., 2000; Schnell et al., 2002).

Em geral, a ativação de células OFF parece resultar em inibição da entrada nociceptiva (Fields et al., 1983; Fields & Heinricher, 1985), enquanto que as características de resposta de células ON sugere um papel na facilitação da dor descendente (Barbaro et al., 1986; Calvino & Grilo, 2006; Heinricher et al., 1989). No geral, experimentos com animais, envolvendo hiperalgesia parece aumentar a atividade das células ON (Bederson et al., 1990; Kim et al., 1990), enquanto manipulações com hipoalгésico ou analgésicos levam ao aumento do disparo de células OFF. Estes achados sugerem que o PAG e RVM pode desempenhar um papel importante não só para a analgesia, mas também no desenvolvimento e na manutenção de estados de dor crônica, a qual pode ocorrer na ausência de lesões aparentes dos tecidos (Staud, 2013). Em suma, o equilíbrio entre os dois sistemas de controle descendente pode vir a

determinar o nível geral de excitabilidade da rede de neurônios no corno dorsal, que por sua vez podem modular a transmissão de sinais de dor para as estruturas do sistema nervoso central supraespinhais (Calvino & Grilo, 2006) .

2.7.CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, a ocorrência de hipotireoidismo materno durante a gestação, sobretudo na forma subclínica, apresenta grande potencial em gerar desordens transitórias ou definitivas ao longo da vida da prole. Neste contexto, há indícios de que o desenvolvimento da circuitaria neuronal e somatossensorial fetal é claramente dependente de HTs de origem materna. Por isso, a deficiência destes hormônios durante a vida intrauterina pode contribuir para a origem de doenças hiper ou hipoalgésicas crônicas, sem causa aparente, e que acometem indivíduos mais tardiamente em suas vidas. No entanto, até o presente momento, muitas lacunas acerca dos mecanismos fisiológicos que envolvem os efeitos do hipotireoidismo materno nos sistemas biológicos de controle nociceptivo da prole, permanecem obscuras.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar as repercussões da carência dos hormônios tireoideanos (HTs) maternos (durante a gestação) nos circuitos biológicos de controle da nocicepção da prole de ratos.

3.2. Objetivos específicos

1. Investigar o efeito da carência dos HTs durante a gestação na massa corporal das mães, duração da gestação e número de filhotes por ninhada;
2. Investigar o efeito da carência dos HTs durante a gestação na massa corporal da prole de ratas aos 60 DPN;
3. Investigar o efeito da carência dos HTs durante a gestação nas concentrações séricas de TT3 e TT4 na prole de ratas aos 60 DPN.
4. Investigar o efeito da carência dos HTs durante a gestação no sistema serotoninérgico, opioidérgico, glutamatergico, dopaminérgico e noradrenérgico na prole de ratas aos 60 DPN;
5. Investigar o efeito da carência dos HTs durante a gestação no conteúdo neuronal de tirosina hidroxilase na substância cinzenta periaquedutal porção ventrolateral (PAGvl) na prole de ratas aos 60 DPN;
6. Investigar o efeito da carência dos HTs durante a gestação nos parâmetros oxidativos na medula espinhal da prole de ratas aos 60DPN

4.JUSTIFICATIVA

Este trabalho pode ser justificado pelos seguintes motivos: 1. Prevalência considerável de hipotireoidismo materno durante a gestação (5,5% a 15% podendo chegar a 37.5% em populações específicas); 2. reconhecida influência dos HTs maternos no desenvolvimento fetal, sobretudo do sistema nervoso central; 3. carência de dados correlacionando hipotireoidismo gestacional e nocicepção supraespinal na prole antes e após manipulação farmacológica; 4. falta de política pública que institua, como compulsória, a investigação e restauração da função tireoidiana de toda gestante que acesse o SUS; e 5. alta prevalência de desordens de origem desconhecida ao longo da vida da prole, como, por exemplo, aquelas relacionadas com a percepção dolorosa (Ex.: Fibromialgia).

5.MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.Animais utilizados

Foram utilizadas três categorias de ratos Wistar obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. São elas: **Categoria I.** fêmeas adultas (150 a 200g) que foram acompanhadas para acasalamento programado. Confirmada as gestações, as ratas foram submetidas ao protocolo de indução de hipotireoidismo durante a gestação (grupo metimazol - MTZ) ou receberam água de torneira (grupo Controle); **Categoria II.** machos adultos (250 a 300 g) para acasalamento com as fêmeas adultas da categoria I; **Categoria III.** ratos adultos jovens com 60 dias pós-natal (DPN) filhos de mães com hipotireoidismo ou eutireoidismo durante o período gestacional.

Enquanto não estavam gestantes, as fêmeas da categoria I foram mantidas em caixas de polycarbonato coletivas com 2 animais por caixa. Diariamente tiveram seu ciclo estral acompanhado por meio de análise colpocitológica para que, na fase do proestro, fossem expostas a rato Wistar adulto para acasalamento. A confirmação do coito foi feita pela detecção microscópica de espermatozóide no lavado vaginal. Confirmado o coito, cada fêmea foi acondicionada individualmente em caixa de polycarbonato, onde permaneceram por toda a gestação, parto e lactação. No dia 3 após o nascimento, os filhotes foram sexados e mantidos em amamentação em ninhadas com, no máximo, oito animais. No dia 21 após o nascimento, a ninhada foi desmamada e os filhotes machos transferidos para caixas coletivas, com até cinco animais por caixa. As fêmeas foram eutanasiadas por overdose de anestésico (Tiopental -100mg/kg). Durante todo o período, os animais tiveram livre acesso a água e a comida. As salas de manutenção dos animais e experimentação, localizadas no Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental (LANBAC), tinham luminosidade controlada com ciclo claro-escuro de 12/12h (luz das 6 às 18 horas), e temperatura de 23 ± 2°C, tendo livre acesso à alimentação e água. Os animais receberam água de torneira e foram alimentados com ração específica para roedores.

Todos os procedimentos aos quais os animais utilizados neste estudo foram submetidos estão de acordo com as normas e princípios éticos preconizados pela Lei Arouca, Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e Utilização de Animais (DBCA) e pelo Conselho nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe, sob o nº 29/12.

5.2. Drogas utilizadas e protocolo de indução do hipotireoidismo gestacional experimental

Para a indução de hipotireoidismo gestacional experimental, foi utilizado o inibidor da iodoperoxidase, metimazol (MTZ), administrado *ad libitum* na concentração de 0,02% na água de beber (água de torneira) a partir do nono dia de gestação (DG) até o dia do parto (Sala-Roca et al., 2002). Esta concentração ofertada por 10 dias é hábil para gerar hipotireoidismo em ratas prenhas, visto que se evidencia redução nos níveis circulantes de T3 total e T4 total (Ahmed et al., 2010). Esta solução foi protegida da luminosidade e trocada a cada três dias. As fêmeas controles (eutireóideas) receberam água de torneira *ad libitum*.

5.3. Acompanhamento das mães

Desde o momento da seleção das fêmeas adultas que comporiam a categoria I do experimento, estas foram pesadas em dias alternados até o parto. Foi utilizado, para fins estatísticos, o peso das fêmeas antes do acasalamento e 11 dias após o início do tratamento com MTZ (20º dia de gestação). Acrescido a isto, foi avaliado o tempo de gestação das ratas prenhas de ambos os grupos, bem como o número de filhotes por ninhada.

5.4. Acompanhamento da prole

A prole de machos das mães hipotireoideanas e eutireoideanas foi acompanhada semanalmente, quanto ao peso corporal, do nascimento até o dia 60 pós-natal

5.5. Dosagem de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4)

5.5.1. Coleta de sangue para dosagem de T3 e T4

Amostras de sangue foram coletadas por decaptação. O sangue coletado foi colocado em tubos de polipropileno para centrífuga de fundo cônico (tipo Falcon) de capacidade 15 mL, modelo 2K15, da marca Sigma Laborzentrifugen. Posteriormente, o sangue foi centrifugado (10000 rpm por 10 min) e o plasma separado das amostras com a ajuda de uma pipeta e colocado em microtubos tipo eppendorf, previamente identificados, sendo posteriormente armazenados a -80°C até o momento das dosagens das concentrações séricas por kit comercial.

5.5.2. Radioimunoensaio (RIE) para T3 e T4 totais

As concentrações séricas totais de T3 e T4 foram mensuradas utilizando kits comerciais (T3, MP Biomedicals, Ohio, USA; Catalog number: 06B-254215, lot number: T3K1432, 33, 34; T4, MP Biomedicals, Ohio, USA; Catalog number: 06B-254011, lot number: T4K1443,44,45 contendo anticorpos específicos aderidos á parede dos tubos de polipropileno e com T3 e T4 ligados ao radiotraçador (^{125}I) com atividade específica de 5 Uci/ μg .. As curvas padrão foram realizadas com T3 e com T4 em soro de rato livre de iodotironinas (soro zero) nas concentrações de 25 a 1000 ng/dL e 1 a 50 μg /dL, respectivamente. Todo o procedimento foi realizado seguindo as recomendações do fornecedor. Os resultados foram expressos ng/dL para o T3 e em μg /dL para o T4

Em todos os radioimunoensaios, as amostras foram dosadas em duplicata e a detecção da radioatividade foi realizada em um cintilador de fase sólida (1470 Wallac Wizard tm automatic gamma counter).

5.6. Imunofluorescência

5.6.1. Perfusão transcardíaca

Os animais foram anestesiados através da injeção intraperitoneal com uma combinação de Ketamina (90 mg/kg) e Xilazina (10 mg/Kg). A perfusão transcardíaca

foi realizada com o objetivo de coletar o cérebro para a realização dos estudos de imunofluorescência.

Após aprofundamento na anestesia e verificação da cessação de resposta raquimedular, realizou-se uma incisão longitudinal desde a região púbica até a incisura jugular para a retirada de pele e visualização dos músculos. Uma segunda incisão foi realizada na região púbica em direção ao processo xifoide para a retirada de tecido muscular e visualização do diafragma (separando cuidadosamente o fígado do diafragma). Realizou-se, então, uma pequena incisão inicial no diafragma, da região lateral em direção à região ventral, para exposição da cavidade pleural e abertura da caixa torácica. Em seguida, deslocando cuidadosamente os pulmões, fez-se um corte através da caixa torácica em direção à clavícula, realizando-se um corte similar contralateralmente, expondo a porção ventral do gradil torácico para rebatimento e livre acesso ao coração.

Após visualizar o coração, injetou-se no ventrículo esquerdo uma agulha sem bisel conectada a um sistema de perfusão, cujo objetivo é trocar o tecido sanguíneo por uma solução salina 0,9% tamponada (tampão fosfato, PB, pH 7,4; 0,1 M) à temperatura ambiente, por um período de 5 minutos, a um fluxo de 8 mL/min. Ao término do tempo estimado, a solução salina tamponada foi substituída por uma solução de Formol 10% tamponado (tampão fosfato pH 7,4; 0,1 M) à temperatura ambiente, por um período de 40 minutos, a um fluxo de 8 mL/min.

Posteriormente, os animais foram decapitados e uma incisão na linha média da cabeça foi feita, a partir do pescoço em direção ao fucinho, para a retirada de pele e tecido subcutâneo, com consequente exposição da calota craniana. A seguir, retirou-se a calota craniana e dura-máter, expondo o encéfalo. O cérebro foi, então, retirado e submetido ao processo de pós-fixação, onde o tecido coletado permanece imerso na mesma solução de fixação utilizada na perfusão (Formol 10% em PB) durante 2 horas.

Em seguida, o cérebro passou pelo processo de crioproteção, que consiste em armazenar o cérebro em uma solução de sacarose 30% tamponada (tampão fosfato 0,1

M, pH 7,4), onde permaneceu até a sua completa precipitação (entre 48 e 72 horas), à temperatura de - 4°C.

5.6.2. Imunomarcção de Tirosina Hidroxilase (TH) na substância cinzenta periaquedutal porção ventrolateral (PAGvl)

Após a completa precipitação, os cérebros, armazenados em solução de sacarose 30% tamponada, foram levados ao criostato (Leica CM1520), a -20°C, para a obtenção de secções coronais seriadas (1:2) com 20 µm de espessura, através da substância cinzenta periaquedutal porção ventrolateral (PAGvl) no mesencéfalo, de acordo com o atlas estereotáxico (Barbaresi et al., 2012; Benarroch et al., 2010).

As secções cerebrais a serem analisadas foram processadas em livre flutuação, à temperatura ambiente (22°C), e inicialmente lavadas em tampão (pH 7,4) fosfato salina (0,01 M), PBS, (cinco lavagens com duração de cinco minutos, cada). Além disso, o mesmo processo de lavagem ocorreu após a exposição aos reagentes de cada etapa. Em seguida, o tecido foi incubado em uma solução de soro de cavalo (10%) e Triton X-100 (0,1%), diluídos em PBS (0,01 M) (durante uma hora), para bloqueio das ligações inespecíficas.

Após essa etapa para bloqueio das ligações inespecíficas e lavagens, procedeu-se às incubações com os anticorpos primários utilizados no presente estudo. As secções foram incubadas em PBS (0,01 M) contendo Triton X-100 (0,1%), anticorpo contra tirosina hidroxilase (policlonal, produzido em coelho, Sigma Aldrich – Lote: SLBK118V) na diluição 1:5000. O tecido foi mantido incubado com solução contendo os anticorpos primários *overnight* (23 h).

Após o período de exposição aos anticorpos primários, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários anti-coelho produzido em burro e conjugado ao Alexa Fluor 488 (policlonal, Life Technologies) 1:2000 em solução de PBS (0,01 M) contendo Triton (0,1%), durante duas horas. Após as lavagens em PBS (0,01 M) (três vezes de cinco minutos, cada), as secções coronais foram montadas em lâminas

gelatinizadas com 70 µL de solução de montagem, cobertos com lamínulas e vedados com tinta esmalte.

A imunofluorescência foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia Básica e Comportamental (LANBAC) do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS) seguindo o protocolo descrito anteriormente e que é utilizado rotineiramente no mesmo.

5.6.3. Análise de imagem

Um sistema computadorizado que incluía um microscópio (Nikon Eclipse Ci 45505) acoplado a uma câmara de vídeo (Nikon DS Ri1) foi utilizado para a captura e digitalização das imagens das áreas cerebrais de interesse. Após capturadas, as estruturas foram devidamente delimitadas em acordo com a descrição anatômica de Paxinos e Watson (Paxinos & Watson 2006). As células cujos citoplasma foram positivos para tirosina hidroxilase foram contados manualmente por três avaliadores cegos. É importante ressaltar que foi realizada análise estatística para confrontar a contagem dos avaliadores e confirmar a ausência de discrepância entre os mesmos (ANOVA two-way, fator avaliador $p > 0,05$). Secções representativas em todos os grupos foram fotografadas em planos anatômicos similares e analisadas comparativamente.

5.7. Testes comportamentais

5.7.1. Mensuração da nocicepção térmica seriada com morfina

Aos 60 dias pós-natal (DPN), os machos filhos de mães eutireoideas e de mães com hipotireoidismo gestacional foram submetidos à avaliação da nocicepção supraespinal por meio do aparato da Placa quente (AVS, Brasil), aquecida a $52 \pm 0,2^\circ\text{C}$. A avaliação da resposta nociceptiva foi realizada por meio da medida do lapso de tempo entre a aplicação do estímulo térmico e o momento da lambida vigorosa da pata traseira. Esse modelo permite obter informações sobre o mecanismo de regulação da nocicepção

térmica, uma vez que o parâmetro avaliado (i.e.: reflexo de retirada e lambedura vigorosa da pata traseira) é de integração medular e supra-medular. Após isto, estes mesmos animais receberam injeção intraperitoneal de 3 mg/kg de morfina (10mg/mL) e foram novamente alocados na placa quente 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção desta droga para avaliação da latência térmica nociceptiva (Sluka, 2000). O máximo tempo de exposição ao calor, para evitar danos à pele foi de 20 s (Song et al., 2015).

A avaliação de todos os animais na placa quente foi filmada e os vídeos foram assistidos por um avaliador cego que determinou a latência de cada animal incluído no estudo, tanto no tempo basal quanto nos tempos pós morfina. Vale ressaltar que todos os animais foram ambientados (dois dias antes do experimento por 5 minutos cada) ao aparato dois dias antes do dia do experimento.

5.7.2. Mensuração da nocicepção térmica após manipulação farmacológica crônica

Aos 60 dias pós-natal (DPN) os machos filhos de mães eutireoideas e com hipotireoidismo gestacional foram submetidos à avaliação da nocicepção supraespinhal por meio da placa quente. Os filhotes foram alocados individualmente sobre uma placa metálica (AVS, Brasil) aquecida a $52\pm0,2^{\circ}\text{C}$, desencadeando o reflexo de lambida da pata traseira. O máximo tempo de exposição ao calor, para evitar danos à pele foi de 30s (Altun et al., 2015; Jiang et al., 2015; Zhang et al., 2016). A avaliação desta resposta foi realizada por meio da medida do lapso de tempo entre a aplicação do estímulo térmico e o momento da lambida da pata (como descrito anteriormente).

Os filhotes de mães eutireoideas bem como os das mães com hipotireoidismo foram submetidos a este procedimento aos 60 dias de nascidos (medida basal). Em seguida, os mesmos animais avaliados na medida basal receberam injeção intraperitoneal de um inibidor da recaptação pré-sináptica de serotonina (sertralina-10 mg/kg, i.p.) por 21 dias (Zanoveli et al., 2007), antagonista do receptor de glutamato N-metyl D-aspartato (memantina -10 mg/kg, i.p.) dose única (Ahmed et al., 2004) e inibidor da tirosina hidroxilase (Alpha Methyl Para-Tirosina-AMPT, 100 mg/kg, i.p.; Sigma Chemical Company) dose única (Bobinski et al., 2015). Após isto, os animais

foram novamente alocados na placa quente para avaliação da latência nociceptiva 30min após a injeção destas drogas nos dias 1, 3, 11 e 21 para sertralina e apenas no primeiro dia para memantina. Para o AMPT, os animais foram alocados na placa quente três horas após a administração desta droga, em dose única.

A sertralina faz parte das drogas que são inibidoras da recaptação de serotonina (SSRIs) e esta age, especificamente, bloqueando a recaptação pré-sináptica de serotonina no SNC (Fitzgerald & Bronstein, 2013). A memantina é um antagonista não competitivo de receptor N-methyl- D-aspartate (NMDA), com afinidade fraca para moderada (Kavirajan, 2009). A memantina age com potência moderada como um antagonista nos receptores do tipo 5-hidroxitriptamina 3 (5-HT3) e exerce um efeito mais fraco, porém significativo, como um antagonista no receptor nicotínico de acetilcolina *in vitro* (Kavirajan, 2009). Neste sentido, em concentrações clinicamente relevantes, foi estabelecido que ela bloqueia os receptores nicotínicos alfa-7 de acetilcolina de maneira não competitiva, sendo mais eficientes para esta finalidade do que para o bloqueio dos receptores de NMDA isoladamente (Aracava et al., 2005). Além disso, dados sugerem que a administração de memantina tem um efeito estimulante sobre a sinalização colinérgica através dos receptores muscarínicos (Drever et al., 2007).

AMPT é um inibidor da tirosina hidroxilase, uma enzima limitante para a biossíntese das catecolaminas, que resulta na redução funcional de dopamina e norepinefrina (Daubner et al., 2011). A tirosina hidroxilase catalisa a hidroxilação de tirosina para L-DOPA (Molinoff & Axelrod, 1971) (Figura 33).

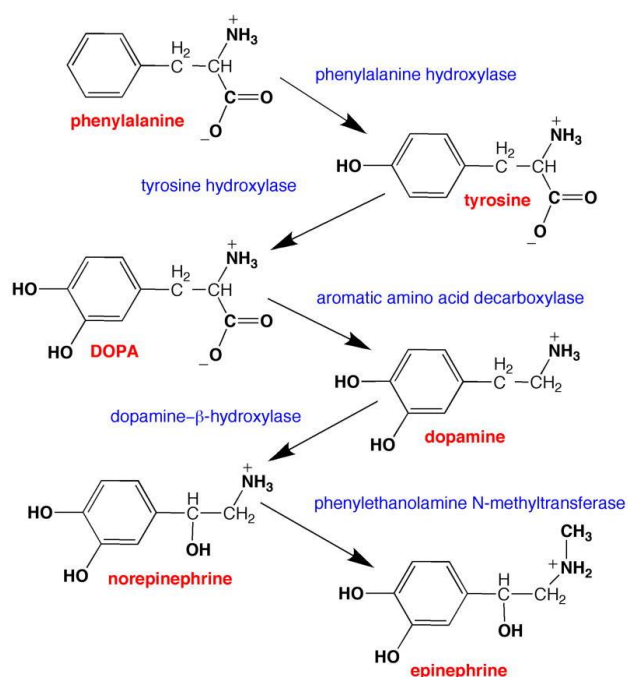


Figura 33. Vias de biossíntese das catecolaminas.

A avaliação de todos os animais na placa quente foi filmada e a latência de destes foi determinada somente após os vídeos terem sido assistidos por um avaliador cego. Vale ressaltar que todos os animais foram ambientados ao aparato nos dois dias que antecederiam o experimento.

5.7.5. Campo aberto

O campo aberto (confeccionado pelo experimentador) é um aparato circular de polietileno com fundo preto, medindo 95 cm de diâmetro e 60 cm altura, sem teto. Foi posicionada uma câmera sobre o campo aberto a uma altura de 230 cm. A câmera foi conectada a um computador equipado com um programa de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, USA) para registro dos parâmetros comportamentais. O fundo do campo aberto tinha a cor preta para aumentar o contraste, favorecer o desempenho do programa e com baixa luz, a fim de não proporcionar ansiogênese.

Os animais foram colocados no centro do campo circular e tiveram seus comportamentos avaliados durante 5 minutos. Este teste em baixa luminosidade tem, como principal pressuposto, a avaliação do comportamento exploratório, através da

medida da ambulação e orientação quanto ao espaço e tempo, pois existe uma tendência de diminuição exploratória ao longo do tempo (Genaro & Schmidek, 2002).

A avaliação comportamental incluiu a distância percorrida total (distância em metros do percurso realizado pelo animal). Cada animal foi avaliado separadamente e o aparato foi limpo com solução de álcool a 10% ao final de cada uso. É importante salientar aqui que todos os animais, logo após o teste da Placa quente, passaram pelo campo aberto a fim de garantir que as possíveis alterações comportamentais observadas nos animais estudados quando expostos a placa quente, foram decorrentes de alterações na circuitaria nociceptiva e não de distúrbios motores.

É importante ressaltar aqui que todos os testes comportamentais (placa quente com as diferentes drogas e o campo aberto) foram realizados por um único investigador, que foi treinado previamente para utilização dos aparatos e que foi mantido cego ao longo de toda coleta de dados.

5.8. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

5.8.1 Coleta do fluido cerebrospinal da cisterna magna

Os filhotes aos 60 DPN, provenientes das ratas mantidas eutireoideas e hipotireoideas durante a gestação, foram anestesiados com a mistura anestésica de Ketamina (90 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) e após verificação dos reflexos, foram alocados no aparelho estereotaxico (Insight, Brasil). A cabeça dos mesmos foi posicionada em flexão máxima (ângulo de 90 graus com o pescoço), foi realizada a tricotomia craniana seguida da palpação da cisterna magna e punção da mesma (Pegg et al., 2010) com seringa (BD Ultra-fine II, 6 mm de comprimento e 0,25 mm de espessura). O liquor coletado da cisterna magna (50 µL - 100 µL) foi centrifugado (centrifuga modelo 2K15 da marca Sigma Laborzentrifugen) a 1000 rpm por 3 min e o sobrenadante foi pipetado e estocado em eppendorf no freezer -80°C. Após a coleta do LCR os animais, ainda anestesiados, foram submetidos a decaptação e a medula espinhal foi dissecada e coletada para avaliação dos parâmetros oxidativos (vide item 5.9.1).

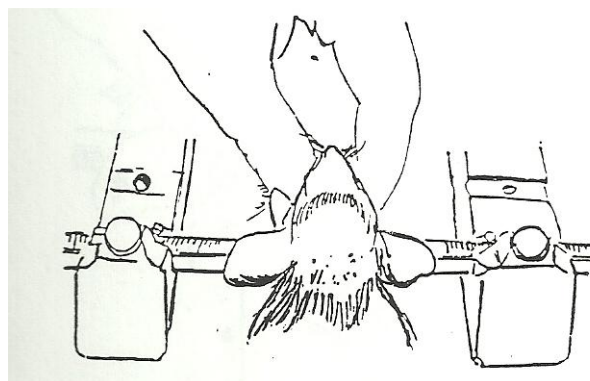


Figura 34. Posicionamento do animal no aparelho estereotáxico para realização da punção da cisterna magna.

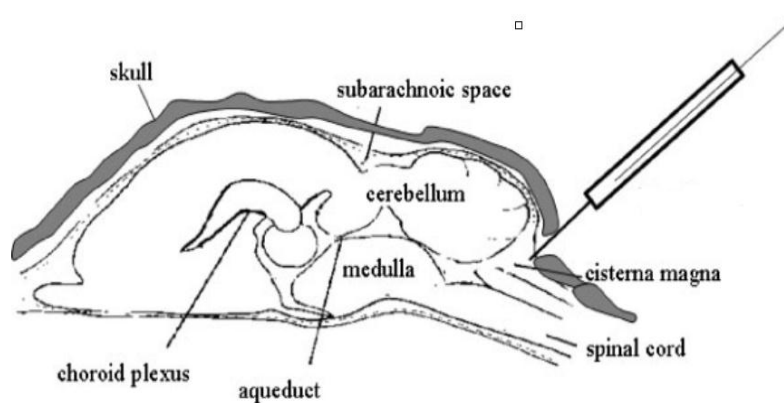


Figura 35. Representação da punção da cisterna magna com seringa (Liu et al., 2004)

5.8.2. Quantificação do conteúdo de glutamato no líquido cerebroespinal

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada no fluído cerebro espinal (FCE) com alíquotas de sobrenadante isento de células para quantificar níveis de glutamato (de acordo com Joseph M.H. & Marsden C.A., 1986). As amostras foram derivatizadas com o-phthalaldehyde e a separação foi realizada com uma coluna de fase inversa (Supelcosil LC-18, 250 mm ×4,6 mm, Supelco) em um cromatógrafo líquido Shimadzu Instruments em parceria com o Porf. Dr. Diogo Onofre da UFRGS (injeção de válvula de ciclo 50 mL). A fase móvel fluíu em uma taxa de 1,4 mL /min e a temperatura da coluna era de 24 ° C. A composição do tampão era A: 0,04 mol/L de di-

hidrogenofosfato de mono-hidrato de sódio de tampão de fosfato, pH 5,5, contendo 20% de metanol; B: 0,01 mol / L de di-hidrogenofosfato de sódio tampão de fosfato de mono-hidrato, pH 5,5, contendo 80% de metanol.

O perfil do gradiente foi modificado de acordo com o conteúdo de tampão B em fase móvel: 0% a 0,00 min, 25% em 13,75 min, 100% em 15.00-20,00 min, 0% em 20,01-25,00 min. A absorvância foi lida a 360 nm e 455 nm, excitação e de emissão, respectivamente, de um detector de fluorescência Shimadzu.

5.9. Avaliação dos parâmetros oxidativos

5.9.1 Coleta da medula espinhal

Os filhotes aos 60 DPN, provenientes das ratas mantidas eutireoideas ou hipotireoideas durante a gestação, foram anestesiados com a mistura anestésica de Ketamina (90 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) e após verificação dos reflexos e punção da cisterna magna passaram pelo procedimento de decaptação e a medula foi rapidamente extraída por dissecação. A medula espinhal foi coletada e armazenada em eppendorf que foi congelado em nitrogênio líquido. *A posteriori*, todos os eppendorfs foram estocados em freezer a -80°C.

5.9.2. Parâmetros oxidativos na medula espinhal

5.9.2.1 Determinação do grau de peroxidação lipídica

O complexo formado por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é amplamente utilizado como biomarcador de peroxidação lipídica em sistemas biológicos, pois a determinação destes produtos envolve a quantificação dos aldeídos formados durante a peroxidação lipídica, resultantes da degradação de hidroperóxidos, que reagem com o ácido tiobarbitúrico, incluindo o malonaldeído (MDA).

Amostras da medula espinhal foram pesadas e homogeneizadas em 10 volumes de solução de fosfato de potássio (10 mM, pH 7,4) contendo butil-hidroxitoluol (BHT; 12,6 mM) utilizado para prevenir a oxidação durante o preparo. A seguir, alíquotas

contendo 200 µL do homogenato (em duplicata) foram incubadas a 90°C durante 45 min com 400 µL de solução contendo TBA a 0,37%, em meio ácido (ácido tricloroacético (TCA) a 15% e ácido clorídrico a 0,25 N). No final da incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 14000 rpm, e 300 µL do sobrenadante foram retirados e submetidos à extração do produto de reação com igual volume de n-butanol e 30 µL solução saturada de NaCl, seguida pela agitação em vórtex por 30 s e centrifugação durante 2 min a 14000 rpm. Os sobrenadantes (fase orgânica) foram pipetados em placa de 96 poços para leitura dos valores de absorbância em leitor de microplaca Espectra Max plus 384 (Sunnyvale, EUA) a 535 nm (corrigidos pelos valores de absorbância a 572 nm). Os resultados foram expressos como pmol de MDA/mg de tecido (Bose et al., 1989), utilizando-se, para o cálculo, o coeficiente de extinção molar do MDA de $1,55 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

5.9.2.2 Determinação do conteúdo de sulfidril

Grupamentos tióis indicam padrão redox do meio celular. Se há maior quantidade de sulfidril, supõe-se que o meio encontra-se redutor; se há menor quantidade de sulfidril, meio oxidante. Na técnica, os grupos SH livres das proteínas reagem com 5,50-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), resultando na formação da proteína tionitrofenilada e um ânion – 2-nitro-5-tiobenzoato –, amarelado. O conteúdo total de tióis foi determinado pelo método do ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) - reagente DTNB (Sigma, St. Louis, MO, EUA).

Amostras da medula espinhal foram pesadas e homogeneizadas em 10 volumes de solução de fosfato de potássio (10 mM, pH 7,4). Em seguida foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram separados e submetidos à dosagem de proteínas, para normalização na concentração de 1 ug/uL. O teste do reagente DTNB foi realizado conforme condições descritas anteriormente. Em suma, 50 µl da amostra normalizada foi misturada a 115 µl de PBS e 35 µl de tampão forte (EDTA e ácido bórico) (pH 8,5). A reação foi iniciada pela adição de 10 µl de DTNB. Os brancos, que não incluíam amostra (proteína), foram processados simultaneamente. Após uma hora de incubação em temperatura ambiente, leu-se a absorbância a 412 nm e mediram-se as quantidades de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) formado (equivalentes à quantidade de grupos sulfidrilas) (Ellman, 1959).

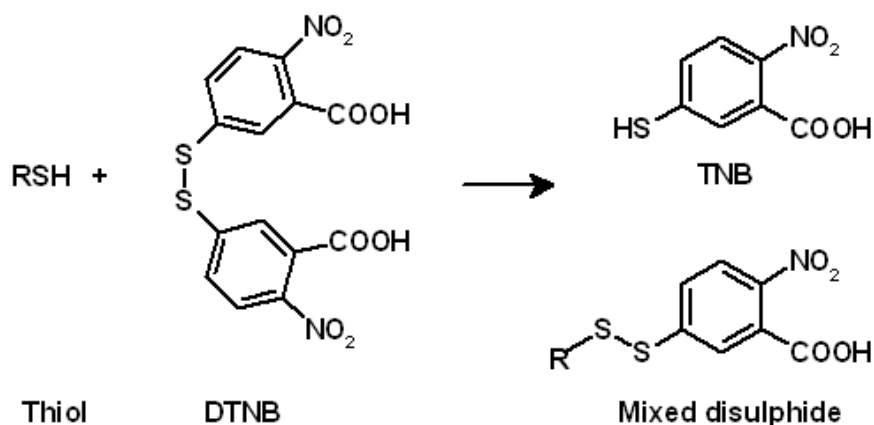


Figura 36. Reação DTNB/Thiol.

5.9.2.3 Determinação do conteúdo de nitrito medular

As concentrações de nitrito na medula foram determinadas usando o reagente de Griess, adaptado de Grisham et al. (1996). Para o preparo do reagente de Griess, foram misturadas quantidades iguais (1:1), de sulfanilamida à 1% e N-(1-naftil) etilenodiamina dihidrocloridrato à 0,1% em ácido fosfórico à 5%.

As amostras de medula foram processadas na mesma condição que para dosagem dos grupos sulfidril. Foi adicionado volume de 50 µl de ácido ticloroacético (TCA) 10% à 100 µl do sobrenadante, seguido por centrifugação à 10000 rpm por 5 min à 4°C para desproteinização da amostra. Em uma microplaca de 96 poços, foram colocados 100 µl do sobrenadante de cada amostra. Foi criada uma curva padrão com nitrito de sódio (NaNO₂) 200 µM até a 11^o diluição na base 2. Em seguida, foram adicionados 100µl de reagente de Griess aos poços que continham a curva e as amostras. O controle da reação (branco) foi feito pela adição de 100 µl de solução tampão mais 100µl do reagente de Griess. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 10 min para permitir o desenvolvimento e a estabilização do cromóforo. A absorbância da reação foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda a 540 nm (Grisham et al., 1996).

A análise de regressão linear foi usada para calcular as concentrações de nitrito nas amostras em relação à curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2 , $200\mu\text{M} - 0,1\mu\text{M}$). Os níveis de nitrito das amostras foram expressos em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína e foram analisadas estatisticamente.

5.9.2.4 Dosagem de proteínas

Em todos os experimentos, a concentração total de proteínas nos homogenatos foi medida utilizando-se o reagente BCA. Para traçar a curva de calibração, foram utilizadas concentrações de 10, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de albumina do soro bovino (BSA), diluídas a partir de uma solução mãe inicial de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5.10. Desenho experimental

O presente projeto foi dividido em **quatro blocos experimentais** e todos eles continham as três categorias de animais descritas anteriormente (Categoria I : fêmeas adultas para acasalamento; Categoria II: machos adultos para acasalamento; e Categoria 3: filhotes de mães hipotireoideanas e eutireoideanas).

Bloco I: Dosagem sérica do T3 e T4 totais (RIE)

- 1. Categoria I:** 9 fêmeas adultas para acasalamento
- 2. Categoria 2:** 5 machos adultos para acasalamento
- 3. Categoria 3:** 10 filhotes de mães eutireoideanas e 8 filhotes de mães hipotireoideanas com 60 dias pós natal (DPN) que foram decapitados para coleta de sangue.

Bloco II: Imunofluorescência para Tirosina Hidroxilase (TH)

- 1. Categoria I:** 6 fêmeas adultas para acasalamento
- 2. Categoria 2:** 3 machos adultos para acasalamento
- 3. Categoria 3:** 6 filhotes de mães eutireoideanas e 8 filhotes de mães hipotireoideanas com 60 dias pós natal (DPN) que foram submetidos a

perfusão transcardíaca para retirada dos encefalos e posterior processamento imunohistoquímico.

Bloco III: Experimentos comportamentais

- 1. Categoria I:** 27 fêmeas adultas para acasalamento
- 2. Categoria 2:** 14 machos adultos para acasalamento
- 3. Categoria 3:** 14 filhotes de mães eutireoideanas e 13 filhotes de mães hipotireoideanas com 60 dias pós natal (DPN) que foram submetidos a mensuração da nocicepção térmica seriada com morfina; 8 filhotes de mães eutireoideanas e 8 filhotes de mães hipotireoideanas com 60 dias pós natal (DPN) para mensuração da nocicepção térmica após manipulação farmacológica aguda com memantina (10 mg/kg), administração única; 9 filhotes de mães eutireoideanas e 9 filhotes de mães hipotireoideanas com 60 dias pós natal (DPN) para mensuração da nocicepção térmica após manipulação farmacológica crônica com sertralina (10 mg/kg) por 21 dias consecutivos; 10 filhotes de mães eutireoideanas e 10 filhotes de mães hipotireoideanas com 60 dias pós natal (DPN) para mensuração da nocicepção térmica após manipulação farmacológica crônica com AMPT (100mg/kg), administração única

É importante ressaltar que todos os animais do Bloco III passaram pelo teste campo aberto, logo após serem expostos à placa quente. Isto se justifica pela necessidade de se constatar que as respostas nociceptivas na placa quente (muito dependentes de respostas motoras) são provenientes de alterações nos circuitos ascendentes e/ou descendentes de dor e não de deterioração motora causada pela indução do hipotireoidismo materno ou pelo uso dos farmacos já citados.

Ao final da coleta de dados, todos os animais foram eutanasiados por método recomendado pelo CONCEA (dose excessiva de anestésico tiopental, 100 mg/Kg).

Bloco IV: Coleta do líquido e medula

1. **Categoria 1:** 8 fêmeas adultas para acasalamento

2. **Categoria 2:** 4 machos adultos para acasalamento

Categoria 3: 8 filhotes de mães eutireoideanas e 8 filhotes de mães hipotireoideanas com 60 dias pós natal (DPN) que foram submetidos a punção da cisterna magna e coleta da medula espinhal.

A fim de evitar potencial viés da influência de animais provenientes de uma mesma prole, irmãos da mesma ninhada foram utilizados em experimentos distintos. Animais eventualmente excedentes de cada ninhada foram utilizados em outros estudos em curso no laboratório.

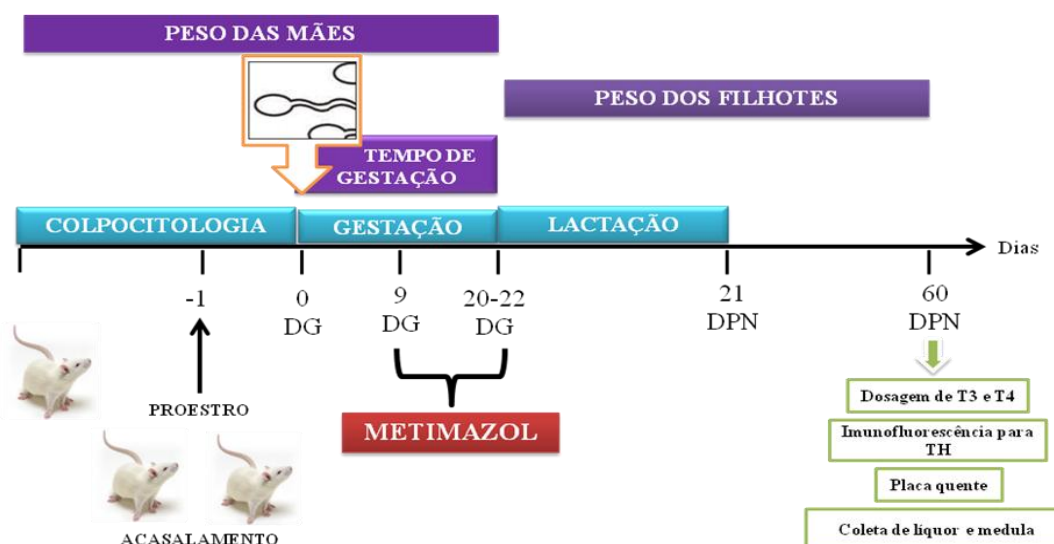


Figura 37. Desenho experimental. DG: Dia de gestação; DPN: dia pós-natal.

5.11. Análise estatística

Os dados referentes aos testes de nocicepção (Placa quente) e desempenho motor (campo aberto) antes e após a administração crônica da sertralina foram analisados por meio do teste estatístico ANOVA *three-way* de amostras repetidas, seguido do *post hoc* test de Bonferroni foi utilizado para avaliar os dados referentes à administração crônica

de sertralina seguida de exposição na placa quente. *Two-way* ANOVA foi utilizado para avaliar estatisticamente os dados referentes à nocicepção térmica antes e após a administração seriada da morfina e os dados referentes a nocicepção térmica e distância percorrida no campo aberto antes e após administração da memantina e AMPT. O teste T foi utilizado para analisar os dados referentes a duração da gestação, número de filhotes por mães, TT4 e TT3 sérico aos 60 DPN, número de neurônios positivos para TH, quantificação de glutamato no líquido e parâmetros oxidativos. Mann Withney foi utilizado para analisar os dados da massa corporal das mães ao longo da gestação e dos filhotes aos 60 DPN. Para a correlação entre distância percorrida no CA e latência na PQ, a distância percorrida no campo aberto, quando disponível, foi utilizada como covariável nas análises de variância que possuíram a latência na placa-quente como variável dependente (ANCOVA com distancia percorrida como covariável). O nível crítico fixado foi de 5% ($P < 0,05$) para se admitir uma diferença de médias como estatisticamente significativa. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) ou mediana e intervalo interquartil.

6. RESULTADOS

Neste estudo, não foram identificadas diferenças no tempo de gestação (figura 38), bem como no número de filhotes por ninhada das ratas tratadas com MTZ quando comparadas as ratas eutireóideas (figura 39). Ademais, as fêmeas foram pesadas no dia da visualização de espermatozoide no lavado vaginal (DG0), no início (DG 9) e após 11 dias de tratamento com MTZ (DG 20) e não houve diferença na massa corporal entre os grupos de ratas [fêmea eutireoidea (FE) e fêmea hipotireoidea (FH)] nas idades gestacionais avaliadas (figura 40).

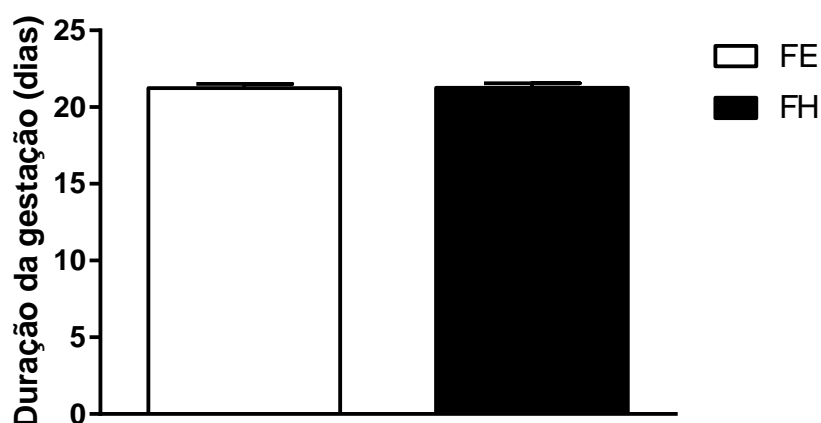


Figura 38. Efeito do HGE na duração da gestação (em dias). Foram incluídas 17 fêmeas eutireóideas (FE) e 20 fêmeas hipotireóideas (FH). Dados são mostrados como média±EPM Student *t* test.

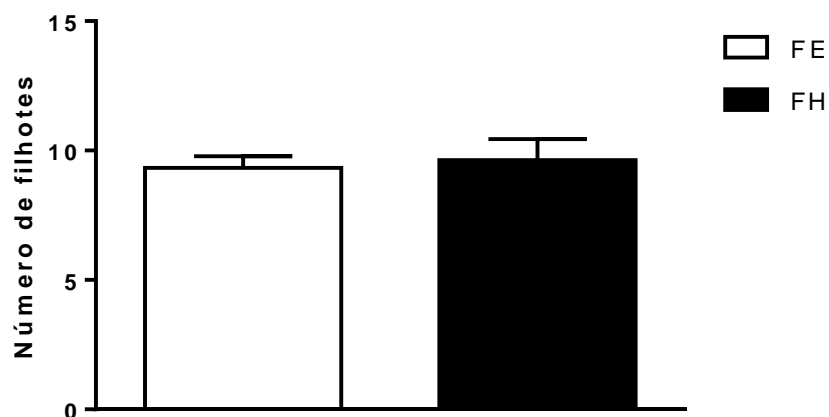


Figura 39. Efeito do HGE sobre no número de filhotes paridos. Foram incluídas 17 fêmeas eutireóideas (FE) e 20 fêmeas hipotireóideas (FH). Dados são mostrados como média±EPM, Student *t* test.

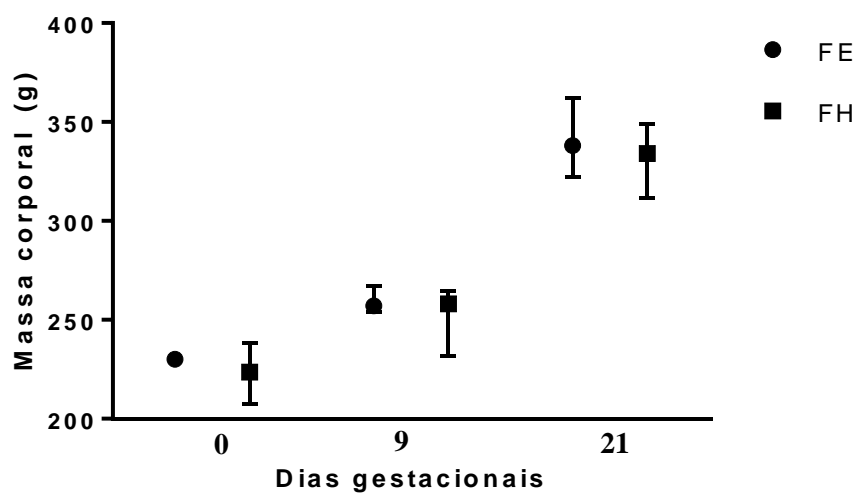


Figura 40. Efeito do HGE no peso corporal das mães, antes (0DG), no início do tratamento (9 DG) e onze dias após o tratamento com MTZ (20DG). Foram incluídas 17 fêmeas eutireóideas (FE) e 20 fêmeas hipotireóideas (FH). Dados são mostrados como mediana± intervalo interquartil, *Mann-Wihney test*.

No que tange à influência do HGE na massa corporal dos animais aos 60 DPN, foi observado que a prole de machos de mães hipotireóideas (PMH) são significativamente mais leves do que a prole de mães eutireóideas [262 (233.5-283) vs 246 (228-261), $p<0,01$] (figura 41).

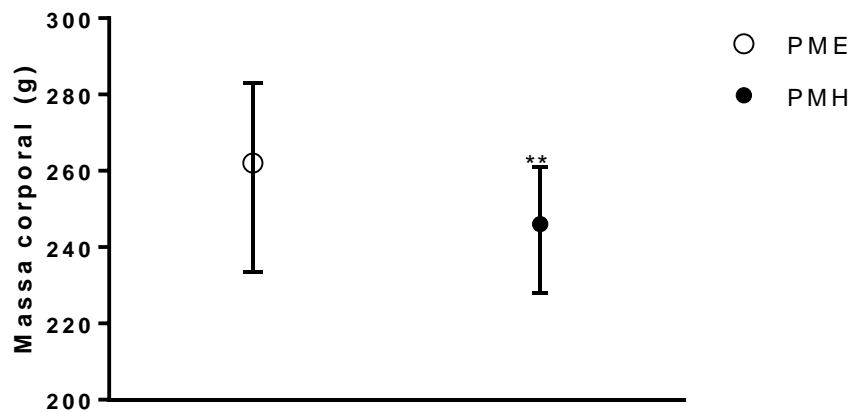


Figura 41. Efeito do HGE sobre a massa corporal aos 60DPN da prole de mães eutireóideas (PME) e hipotireóideas (PMH). Grupo Controle (prole de mães eutireóideas (PME), $n=44$) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas (PMH), $n=46$). Dados são mostrados como mediana \pm intervalo interquartil. (**) $p<0.01$, *Mann Whitney test*.

Observou-se que os filhos de mães hipotireóideas, quando comparados aos de mães eutireóideas, apresentaram maior concentração sérica de triioditironina total (TT3) ($32,38 \pm 2,17$ vs $42,66 \pm 4,48$, $p<0.05$) sem diferença estatística na concentração sérica de tiroxina total (TT4) (figura 42).

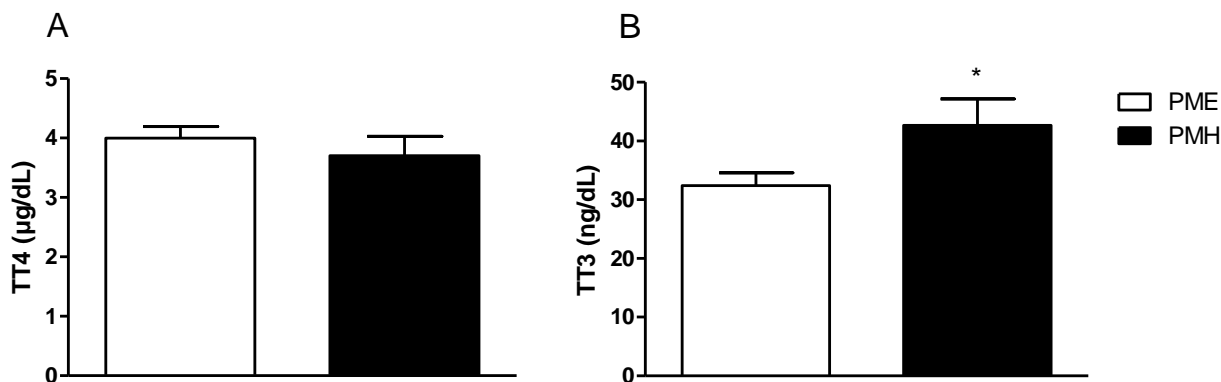


Figura 42. Efeito do HGE nas concentrações séricas de (A) tiroxina total (TT4) e(B) triiodotironina (T3) na prole aos 60 DPN. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], n=8) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=6). Dados são mostrados como média±EPM. (*) $p<0.05$, *Student t test*.

Para os dados de sensibilidade térmica avaliados, por meio da placa quente, no basal e após a administração da morfina é possível observar que houve interação estatisticamente significativa entre os fatores tempo e tratamento ($F(4, 80) = 2,50$; $p < 0,05$), decorrente da menor sensibilidade ao estímulo térmico pela PMH, nos tempos de 30 (10.41 ± 0.9 s vs 12.75 ± 1.0 s, $p < 0.001$) e 60 minutos (11.60 ± 0.7 s vs 13.29 ± 0.3 s, $p < 0.05$), quando comparados a PME (figura 43).

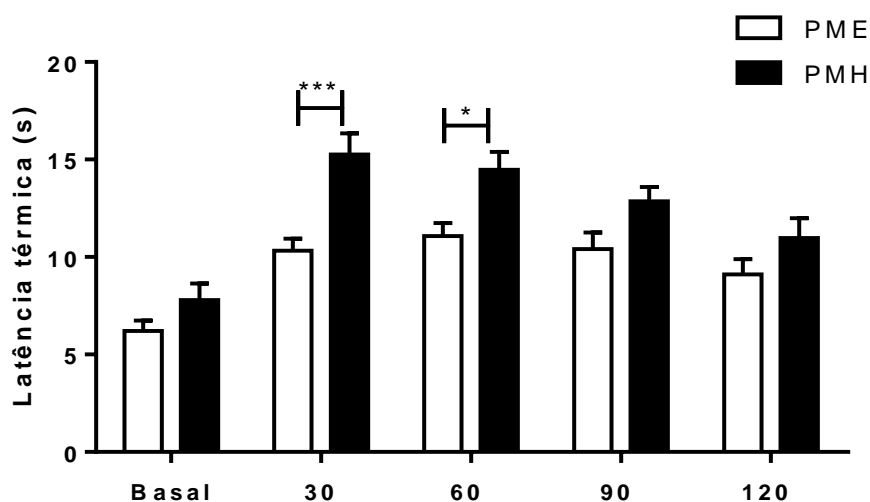


Figura 43. Efeito do HGE na nocicepção térmica da prole aos 60 DPN antes e após a injeção i.p. 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção da morfina. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], n=13) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=11). Dados são mostrados em média±EPM. (*) $p < 0,05$, (***) $p < 0.001$, Anova two-way, Bonferroni *post hoc* test.

Para os dados de sensibilidade térmica supraespinal avaliados no basal e após a administração crônica de sertralina é possível observar que não houve qualquer alteração estatística significativa na placa quente (Figura 44, Painel A). No campo aberto, a droga não afetou a distância percorrida (Figura 44, Painel B), sendo importante ressaltar que não foi observado correlação entre o comportamento dos animais no campo aberto e na placa quente (a covariável distância percorrida não contribuiu para a resposta na placa quente), indicando que o efeito comportamental nos animais na placa quente, promovido pela sertralina, é independente do comportamento no campo aberto.

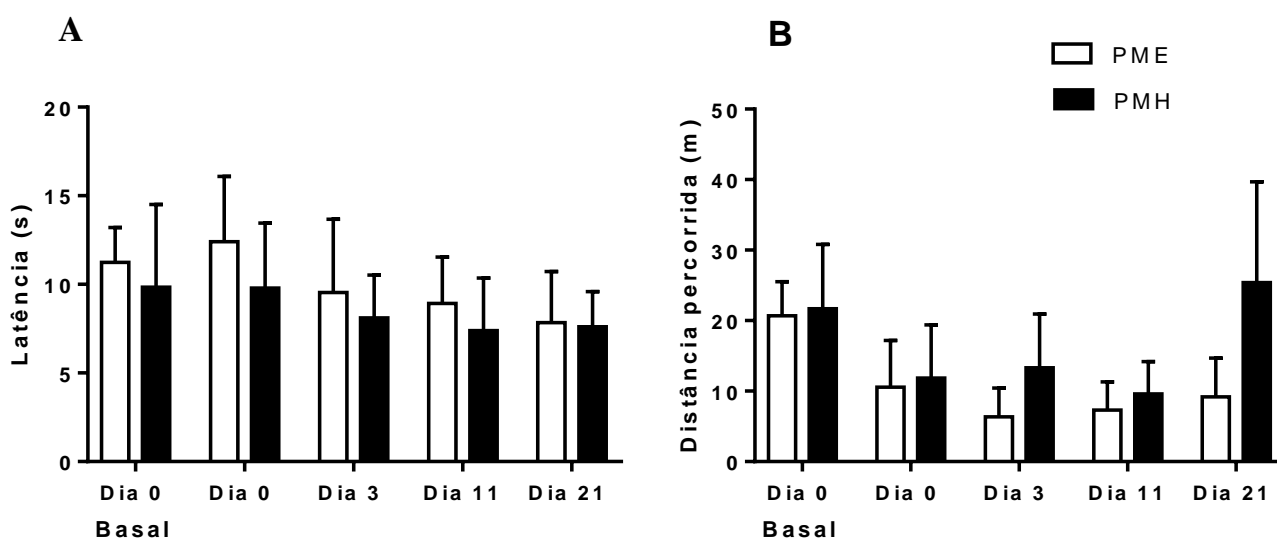


Figura 44. Efeito do HGE na nocicepção térmica (A) na placa quente e a distancia percorrida (B) no campo aberto da prole aos 60 DPN antes e 30 min após a injeção de sertralina nos dias 0, 3, 11 e 21 de tratamento. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], n=9) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=9). Dados são mostrados em $\text{media} \pm \text{EPM}$. *Anova two-way*, seguido do Bonferroni *post hoc test*.

Quando os animais foram avaliados na placa quente antes e três horas após a injeção intraperitoneal de AMPT, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos (PMH x PME) (figura 45, Painel A), sendo que a distância percorrida no campo aberto reduziu após o AMPT independente do grupo (fator tempo: $F(1, 84.1) = 1989$; $p < 0.0001$) (figura 45, Painel B). Não foi possível observar correlação significativa entre os comportamentos dos animais na placa quente e no campo aberto.

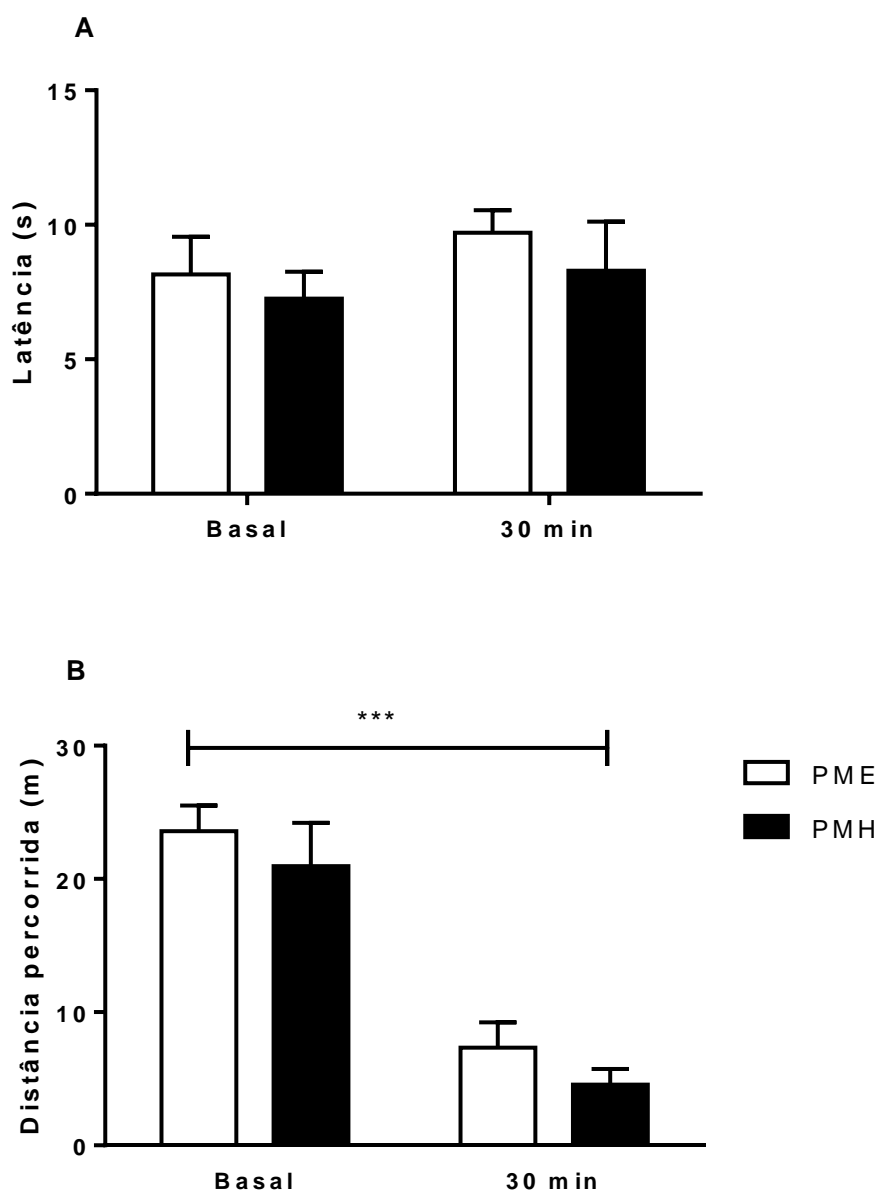


Figura 45. Efeito do HGE na nocicepção térmica (A) na placa quente e a distancia percorrida (B) no campo aberto da prole aos 60 DPN antes e 3 horas após a injeção i.p. de AMPT. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], $n=10$) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], $n=10$). Dados são mostrados em media±EPM. Anova two-way, seguido do Bonferroni *post hoc test*.

A quantificação de neurônios positivos para tirosina hidroxilase (TH) na substância cinzenta periaquedutal ventrolateral (PAGvl) revelou ausência de diferenças entre os grupos (figura 46).

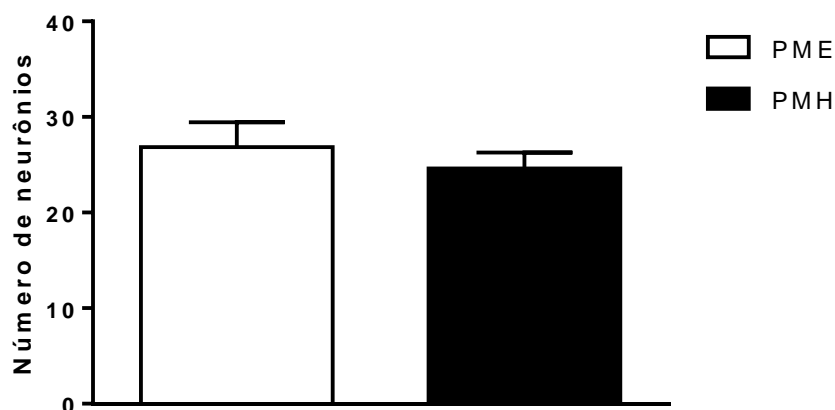


Figura 46. Efeito do HGE no número de neurônios positivos para Tirosina hidroxilase na PAG ventrolateral aos 60 DPN. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], n=6) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=6). Dados são mostrados em média±EPM. *Student t test.*

A avaliação comportamental do sistema glutamatérgico por meio da placa quente antes e 30 minutos após a injeção intraperitoneal de memantina evidenciou ausência de diferenças entre os grupos experimentais (fator tratamento e interação $p > 0.05$) e diferença estatística apenas para o fator droga ($F(1,15) = 6.96$; $p < 0.05$), independente dos grupos estudados (figura 47, Painel A). No campo aberto, a memantina promoveu redução da distância percorrida igualmente entre os grupos (fator droga: $F(1,30) = 30.78$; $p < 0.001$) (figura 47, Painel B), sendo importante ressaltar que a covariável distância percorrida contribuiu significativamente para o modelo. Isto é, a redução da distância percorrida no campo aberto, 30 min após a administração da memantina, potencialmente justifica a redução da latência observada após a administração i.p. da droga nos animais avaliados.

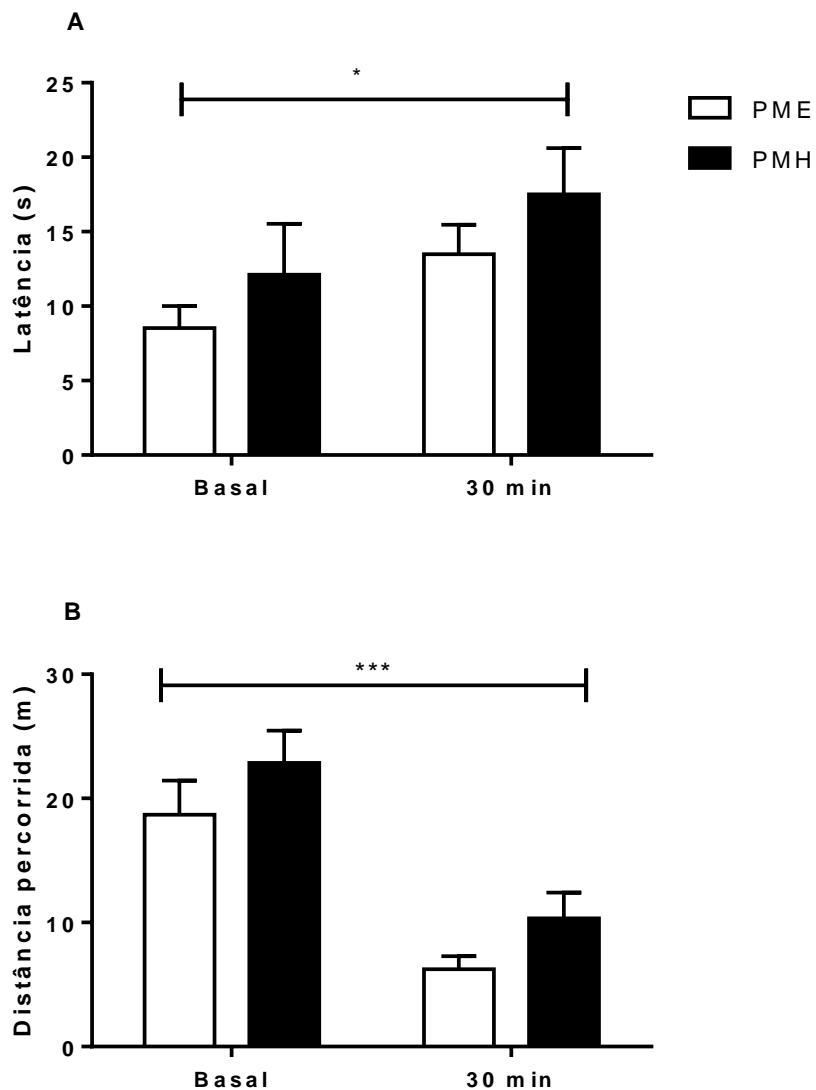


Figura 47. Efeito do HGE na nocicepção térmica (A) na placa quente e distância percorrida (B) no campo aberto e correlação entre distância percorrida e latência na placa quente (C) da prole aos 60 DPN antes e 30 min após a injeção i.p. de Memantina. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], n=8) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=8). Dados são mostrados em média±EPM. Anova two-way, seguido do Bonferroni *post hoc* test.

A quantificação de glutamato no líquido cefalorraquidiano (LCR) mostrou redução de glutamato no líquido da PMH quando comparado ao grupo controle ($4,32 \pm 0,71$ vs $2,11 \pm 0,14$, $p<0.01$) (figura 48).

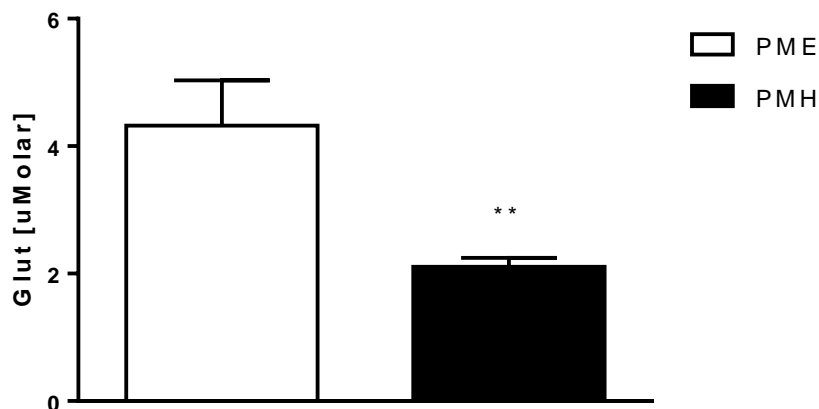


Figura 48. Efeito do HGE no conteúdo de glutamato no LCR na prole aos 60 DPN. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME] n=6) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=6). $p < 0.01$, *Student t test*.

A quantificação indireta do aumento da oxidação na medula espinhal, nos grupos experimentais avaliados aos 60 dias pós natal, evidenciou ausência de diferença estatística para sulfidril e nitrito (figura 49, painel A e B, respectivamente) e aumento significativo na peroxidação lipídica na PMH quando esta foi comparada a PME (figura 49, painel C, $0,92 \pm 0,19$ vs $1,4 \pm 0,09$, $p < 0.05$).

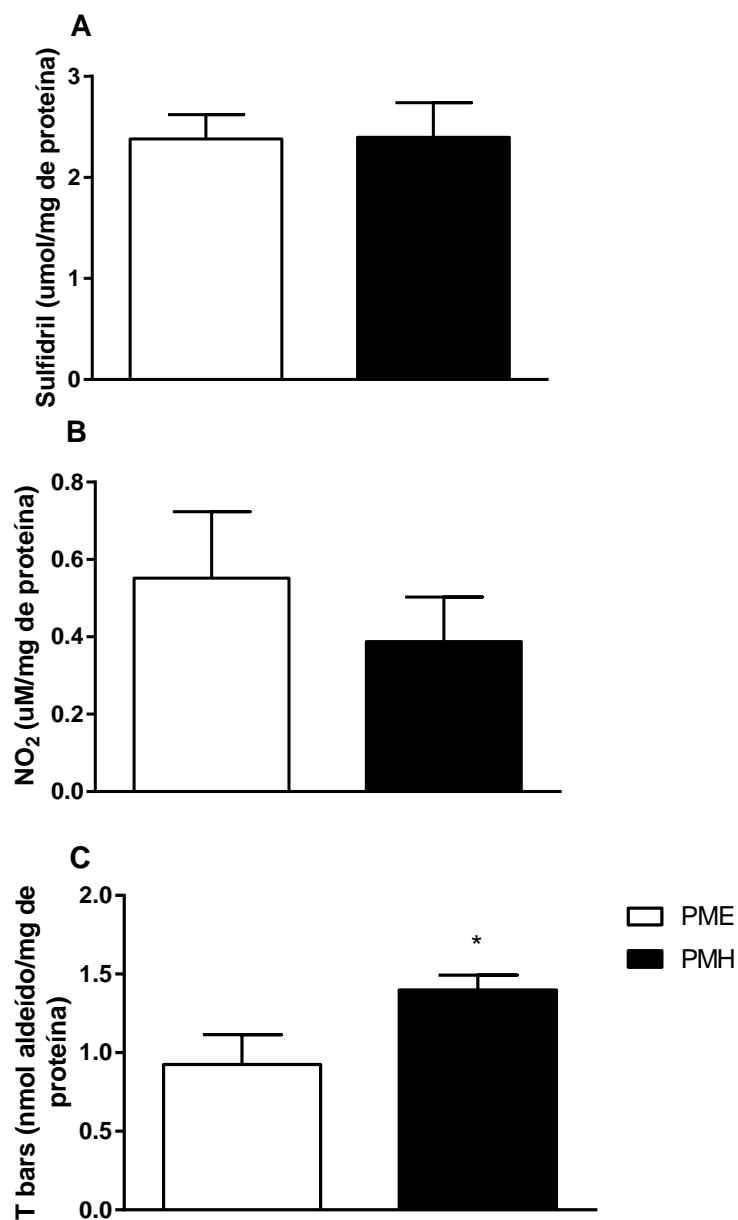


Figura 49. Efeito do HGE nos parâmetros oxidantes na medula espinhal da prole aos 60 DPN. Painei A: Sulfidril; Painei B: Nitrito; e Painei C: T-bars. Grupo Controle (prole de mães eutireóideas [PME], n=8) e Grupo Hipotireoidismo (prole de mães hipotireóideas [PMH], n=8. (*)p<0.05, *Student t test*.

7.DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou que a administração de MTZ induzindo HGE em ratas prenhas não promoveu nenhuma alteração nos parâmetros avaliados nas mães. Entretanto, alterações foram observadas no desenvolvimento corporal, no comportamento nociceptivo após a morfina, no conteúdo de glutamato no LCR e na lipoperoxidação da medula espinhal da prole.

Acompanhamento das mães

O nosso grupo já mostrou, em trabalho previamente publicado (Alves et al., 2013), que o protocolo de indução de hipotireoidismo gestacional (0.02% de MTZ na água de beber do DG 9 até o parto) é eficaz para produzir redução significativa do TT3 e do TT4, no DG 20, nas ratas prenhas tratadas quando comparadas as controles. Acrescido a isto, estudo desenvolvido por Ahmed et al., (2010) já havia apontado que a concentração de 0,02% de MTZ adicionada a água de beber por 10 dias é capaz de gerar, nas ratas prenhas, redução nos níveis circulantes de TT3 e TT4. Mais recentemente, o mesmo protocolo de indução de hipotireoidismo foi utilizado em camundongas prenhas e os autores também observaram redução significativa das concentrações séricas de TT4 e TT3 e aumento do TSH nos animais tratados, quando comparados aos controles (Albornoz et al., 2013).

Os dados do nosso grupo (Alves et al., 2013), que utilizam o mesmo protocolo de indução de HGE, corroboram os nossos achados no que diz respeito à ausência de alteração significativa no ganho de massa corporal pelas ratas prenhas hipotireoideas quando comparadas as controle. Contrariamente, estudo de Lasley & Gilbert, (2011), utilizou PTU (0,001%) e foi evidenciado redução discreta, porém significativa, do peso corporal, no DG 20, de ratas gestantes tratadas a partir do 6º dia de gestação. No entanto, mais uma vez refletindo os nossos achados, van Wijk et al., (2008) mostraram que a indução do hipotireoidismo materno (com dieta pobre em iodo associado a perclorato de potássio a 0,75% na água de beber duas semanas antes do acasalamento até o parto) não afetou o peso corporal das mães tratadas durante o período gestacional. O mesmo foi observado mais recentemente por Kobayashi et al., (2014), que, ao

trataram ratas no período perinatal (DG 15 até 20 DPN) com diferentes doses de PTU (0.5, 1, ou 2 mg/kg/dia, via gavagem), não constataram alteração na massa corporal das mães. Isto aponta para a enorme possibilidade de que uma hipofunção tireoideana não gere, necessariamente, sinais e sintomas clássicos nas gestantes. Clinicamente, até o presente momento, não existem relatos na literatura científica de estudos que comparem o ganho de massa corporal das mães com hipotireoidismo gestacional com as eutireoideas.

No que diz respeito a duração da gestação, não encontramos diferenças entre as ratas tratadas com MTZ e as controle. Estes achados corroboram os achados prévios do nosso grupo Alves et al., (2013). Além disso, concordaram com os nossos resultados Panciera et al., (2007), que identificaram que cadelas tratadas com iodetoradioativo (para induzir hipotireoidismo) durante a gestação, não apresentaram tempo prolongado de gestação quando comparadas as cadelas do grupo controle. No entanto estes dados não estão de acordo com aqueles observados por Hapon et al., (2003) que induziram hipotireoidismo em ratas com PTU (0.1 g/L^{-1}) oito dias antes do acasalamento e identificaram aumento no tempo de gestação das ratas tratadas quando comparadas as do grupo controle. Neste contexto, Albornoz et al., (2013) identificaram que camundongas prenhas tratadas com MTZ 0.02%, exclusivamente no período gestacional (10 DG ao 21 DG) apresentaram menor tempo de gestação. Assim, a chegada com êxito ao termo, ou seja, o parto de um produto vivo também pode coexistir com o hipotireoidismo gestacional, apesar da correlação entre hipotireoidismo (subclínico ou clínico) e aborto ou parto prematuro evidenciada pelos estudos clínicos (Ajmani et al., 2014; Andersen et al., 2016, 2013, 2013; Korevaar et al., 2013; Kumar et al., 2009; Liu et al., 2014; Nambiar et al., 2011; Negro et al., 2010; Ong et al., 2014b; Sahu et al., 2010; Su et al., 2011; Taylor et al., 2014; Wang et al., 2012).

Calvo et al., (1990) e Hapon et al., (2003), similarmente ao que observamos em nossos dados, mostraram que o tratamento com MTZ, a 0,02%, não afeta o número de fetos por ninhada, uma vez que o número de filhotes nascidos vivos não diferiu entre os grupos. Diferente destes achados, estudo prévio que induziu hipotireoidismo em ratas durante a gestação por meio de dieta pobre em iodeto identificou alterações nos índices reprodutíveis destas, morte precoce ou aborto, aumento da ocorrência de natimortos ou

de filhotes nascidos fracos (Sundari et al., 2007). Contrariamente, não identificamos a ocorrência de abortos ou natimortos com a dose de MTZ de 0,02%, apesar da efetividade deste protocolo em gerar hipotireoidismo gestacional (Alves et al., 2013). Tais diferenças, entre os estudos, podem estar relacionada com a duração do protocolo, com a droga ou a concentração utilizada para induzir hipotireoidismo em animais de laboratório, visto que Behzadi & Ganji, 2005, demonstraram que as concentrações de PTU de 0,05% e 0,075%, adicionadas a água de beber de ratas prenhas, aumentaram a mortalidade dos filhotes na segunda semana pós-natal, diferentemente do que foi visto com a dose de 0,005%.

Acompanhamento da prole

Apesar da ausência de modificações importantes nas ratas gestantes, a avaliação da prole de mães induzidas ao HGE mostrou que ocorrem claras e importantes modificações na prole, sobretudo no que diz respeito à massa corporal. Neste contexto, corroborando os nossos achados, dados previamente publicados pelo nosso grupo (Alves et al., 2013) evidenciaram redução da massa corporal da prole de mães com hipotireoidismo na vida adulta (14, 21, 30, 60 e 120 DPN). Em acordo com estes dados, Kobayashi et al., (2014) demonstraram que em todas as doses de PTU utilizadas para induzir HGE em ratas, o peso corporal da prole foi reduzido com 7 semanas de vida (idade similar a dos nossos animais experimentais). Similarmente, Sedaghat et al., (2015), ao tratar ratas prenhas com PTU 0.02% do primeiro dia de gestação ao parto, evidenciaram redução na massa corporal da prole na vida adulta (60 DPN). Contrariamente, Lasley & Gilbert, (2011) relataram redução na massa corporal da prole exclusivamente nas idades iniciais da prole (15 DPN ao 35 DPN), sem alterações deste parâmetro na vida adulta.

São cada vez mais numerosos os estudos clínicos com humanos a respeito das alterações que o hipotireoidismo materno pode provocar na massa corporal da prole. Em um estudo caso-controle, foi evidenciado que o peso médio ao nascimento dos neonatos, em gestações cujas mães apresentam hipotireoidismo subclínico, foi significativamente menor quando comparado aos neonatos filhos de mães eutiróideas (Blazer et al., 2003). Mais recentemente, outros estudos associaram o hipotireoidismo

subclínico materno ao baixo peso dos filhos ao nascer e/ou ao fato destes serem classificados como pequenos para a idade gestacional (PIG), ou seja, com peso abaixo do percentil 10 (segundo a tabela internacional de classificação de neonatos por peso/idade gestacional) (Casey et al., 2007; Chen et al., 2014; Cleary-Goldman et al., 2008; Jubbin J Jacob et al., 2012; Männistö et al., 2009; Ong et al., 2014c; Su et al., 2011; Wang et al., 2012).

A diminuição da massa corporal e do crescimento tem sido comumente encontrado em experimentos nos quais o hipotireoidismo foi induzido em ratos durante o período perinatal e neonatal (Akaike et al., 1991; Brosvic et al., 2002; Dong et al., 2005; Negishi et al., 2005; Sui & Gilbert, 2003). Assim, tem sido relatado que *déficits* dos HTs afetam negativamente o crescimento ósseo e o desenvolvimento dos órgãos através da redução na produção e ação do hormônio de crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) (Wasniewska et al., 2003; Weiss & Refetoff, 1996).

Dados do nosso grupo, ainda não publicados (Carvalho 2014), que avaliaram o comprimento da cauda da prole ratas submetidas ao hipotireoidismo gestacional associado ou não a dieta hiperlipídica, evidenciaram que PMH apresentam menor comprimento da cauda quando comparada ao PME aos 30 DPN ($8,39 \pm 0,09$ versus $8,90 \pm 0,1$ cm, $p < 0,001$) (interação entre os fatores tempo e tratamento, ($F(4,776) = 17,21$, $p < 0,001$). Ademais, para os machos da PMH do 37° ao 120° DPN foi observado que PMH também apresentou menor comprimento da cauda quando comparado ao PME (fator tratamento $F(1,53) = 9,77$, $p = 0,003$).

Neste sentido, está bem estabelecido e têm sido reconhecidos durante 125 anos que os hormônios tireoideanos são requisitos essenciais para o crescimento linear, maturação esquelética e manutenção óssea na vida adulta (Bassett & Williams, 2016). A síndrome da resistência dos HTs em crianças resulta em cessação do crescimento e maturação óssea (Brucker-Davis et al., 1995; Refetoff & Dumitrescu, 2007) e por outro lado, a tireotoxicose (elevação de T4) acelera este processo (Bassett & Williams, 2008; Chawla et al., 2015; Segni et al., 1999). Vários estudos, em camundongos geneticamente modificados evidenciam que o T3 exerce ações anabólicas no

desenvolvimento esquelético, tendo efeito catabólico em adolescentes (ver revisão de Bassett & Williams, 2016). A importância da regulação local da disponibilidade de T3 no osso tem sido demonstrada em estudos que identificam o importante papel da D2 no osteoblasto para otimizar a mineralização e a força óssea (Bassett et al., 2010; Bassett & Williams, 2016; Dentice et al., 2005b; Galton et al., 2009, 2007). Ademais, no que diz respeito à programação fetal, dois estudos clínicos já evidenciaram que alterações nos hormônios tireoideanos maternos (tanto hipotireoidismo quanto hipertireoidismo) aumentam o risco de fechamento precoce das suturas cranianas (craniosinostose) das crianças na vida pós-natal (Carmichael et al., 2015; Rasmussen et al., 2007).

Acrescido a isto, além da ação direta dos HTs na estimulação do crescimento corporal e ósseo, modificações no status tireoideano podem promover alteração de crescimento agindo de forma indireta, através do hormônio de crescimento (GH). Já é sabido, há mais de 30 anos, que os hormônios tireoideanos se ligam ao seu receptor nuclear e estimulam a síntese e liberação do GH (aumentando tanto a expressão do RNAm para GH quanto a expressão da proteína GH) (Fisher et al., 1982). Além disso os HTs potencializam a produção de somatomedinas ou IGF pelo GH e apresentam efeitos anabólicos nas somatomedinas (Fisher et al., 1982; Silva et al., 2010, 2006; Volpato & Nunes, 2001, 1994). Ademais, o T3 aumenta a poliadenilação do RNAm do GH, ou seja, aumenta a estabilidade deste, o que promove aumento da taxa de tradução do RNA (perfil polissomal) culminando no aumento da síntese de GH (Silva et al., 2006, 2010; Volpato & Nunes, 1994, 2001).

Tomados em conjunto, é possível observar que concentrações séricas normais de HTs (principalmente de T3) são essenciais para o adequado desenvolvimento dos órgãos e sistemas, bem como para o crescimento linear. Neste contexto, clinicamente diversos estudos associam o hipotireoidismo materno a restrição do crescimento intrauterino dos fetos (Chen et al., 2014; Nazarpour et al., 2015; Saki et al., 2014; Tong et al., 2016).

Desta forma, sabendo que os hormônios tireoideanos são importantes para a fisiologia do desenvolvimento e maturação corporal e óssea, seja diretamente ou indiretamente (via GH), não há como descartar a possibilidade do HGE induzido em

nosso estudo, ter promovido alterações no crescimento da prole deste o período intrauterino até a vida pós natal, sendo este o responsável pela menor massa corporal encontrada na PMH.

Dosagem de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4)

No que se refere às alterações provocadas pelo hipotireoidismo materno no status tireoideano da prole na vida adulta é importante ressaltar a escassez de estudos prévios que induzam hipotireoidismo em animais de laboratório exclusivamente no período gestacional, como em nosso estudo. Neste sentido, a quantificação das concentrações séricas de TT3 e TT4 na prole no estudo de Kobayashi et al., (2014) revelou que o tratamento das mães no período perinatal com 0.5 mg/kg/dia de PTU (DG 15 até 20 DPN) não promoveu modificações significativas no TT4 total da prole com 7 semanas de vida (idade similar a nossa) porém, inversamente ao que foi encontrado em nosso estudo, reduziu o TT3 sérico na mesma idade. A diferença observada na concentração de TT3, entre o estudo de Kobayashi et al., (2014) e os nossos achados, pode estar relacionada à indução do HGE adotado pelos diferentes trabalhos. O tratamento com PTU durante a lactação, utilizado por Kobayashi et al., (2014), pode ter sido o responsável pela redução do TT3 observado na prole. Sabendo que o PTU atravessa a barreira mamária e pode agir diretamente na prole, bloqueando a atividade da desidrase, isto pode influenciar sobremaneira a conversão de T4 em T3 pela ninhada e produzir redução significativa do TT3 nos animais filhos das mães tratadas, quando comparados ao controle.

Neste contexto, Sedaghat et al., (2015) não evidenciou diferenças no TT3 e TT4 na prole de mães hipotireoideas (PTU 0,02% do DG1 até o parto) com 5 meses de vida quando comparada a prole controle. O mesmo achado pode ser observado por Albornoz et al., (2013) que constataram ausência de diferenças significativas no TT3, TT4 e TSH nos camundongos de mães hipotireoideas (tratadas exclusivamente no período gestacional) aos 55 DPN, quando comparados ao grupo controle. As divergências observadas quando os nossos achados são comparados aos dois últimos estudos

(Sedaghat et al., 2015 e Albornoz et al., 2013) podem estar relacionadas a idade dos animais avaliados e a espécie utilizada (respectivamente).

A alteração exclusivamente nas concentrações séricas de TT3, encontradas no presente estudo, apontam para o fato do HGE, no protocolo utilizado, afetar de forma mais importante a conversão periférica de T4 a T3. Uma vez que, a desidase tipo 2 é a maior fonte de produção de T3 extratiroideana, com base em vários estudos clínicos prévios (Geffner et al., 1975; Maia et al., 2005b; Saberi et al., 1975), e que esta é considerada uma enzima crítica para a homeostase de T3 na periferia devido a sua plasticidade (Bianco, 2004), é possível hipotetizar, a partir dos achados do presente estudo, que o HGE pode ter aumentado sobremaneira a síntese e/ou atividade da D2, sendo este o fator responsável pelo aumento das concentrações séricas circulantes de T3 na prole de mães hipotireoideas. Outra hipótese viável para justificar o aumento do TT3 na prole seria o aumento compensatório das proteínas ligadoras de HTs, nestes animais, como resultado da carência de TT4 e TT3 no período intrauterino.

Embora a disfunção da tireoide durante a gestação venha sendo bastante estudada, informações prévias a respeito do impacto do hipotireodismo materno nos parâmetros da função tireoideana das crianças são escassos. Clinicamente, uma coorte de Pääkkilä et al., (2013) avaliou adolescentes, aos 16 anos, filhos de mães que tiveram hipotireoidismo no primeiro trimestre da gestação (< 20 semanas) e não foram tratadas. Estes autores observaram que estes adolescentes tinham maior concentração média de TSH sérico ($p = .001$), quando comparados a adolescentes de mesma idade filhos de mães eutireoideas no mesmo período gestacional. Estas crianças, filhas de mães hipotireoideas, também apresentaram menor concentração média de T4 livre sérico ($13.2 [11.3-15.6] \text{ pmol/L}$; $p = 0.05$), quando comparadas ao grupo controle. Sendo assim, este estudo aponta para o fato de que crianças filhas de mães hipotireoideas na gestação tem alto risco de se tornarem hipotireoideas (Pääkkilä et al., 2013).

Tomados em conjunto os achados anteriormente descritos, é possível constatar que dados experimentais e clínicos apontam para a possibilidade do hipotireoidismo materno programar permanentemente o eixo hipotálamo-hipofise-tireoide da prole. Existindo a possibilidade de recalibração do *set point* de normalidade, na vida pós natal,

do status tireoideano dos filhos destas ratas/mulheres com hipotireoidismo gestacional, provavelmente em resposta a uma baixa oferta de HTs durante o período intrauterino.

Respostas comportamentais

O efeito do hipotireoidismo, exclusivamente no período gestacional, nas alterações comportamentais nociceptivas foi estudado pelo nosso grupo e foi o primeiro trabalho publicado na literatura científica sobre o tema (Alves et al., 2013). Neste estudo, foi possível evidenciar que filhos de mães hipotireoideas apresentaram redução na latência térmica (hiperalgesia térmica), no *tail flick*, em todas as idades estudadas (7, 15, 23, 30 e 60 DPN) comparados ao grupo controle.

Até o presente momento, nenhum estudo utilizou o teste da Placa Quente com a finalidade de aferir a hiperalgesia térmica supraespinal em animais filhos de mães hipotireoideas. Portanto, não há na literatura qualquer relato a respeito de alterações, induzidas pelo HGE, na hiperalgesia térmica supraespinal (basal e após manipulação farmacológica) da prole. Para tanto, o presente trabalho, de forma inédita, avaliou os filhos de mães hipotireoideas e eutireoideas com o intuito de preencher esta lacuna do conhecimento acerca da hiperalgesia térmica supraespinal, antes e após a administração de diferentes drogas (morfina, sertralina, memantina e AMPT).

Desta forma, foi possível evidenciar que diferentemente dos nossos achados prévios no *tail flick*, os animais filhos de mães com hipotireoidismo, no presente estudo, não apresentaram diferenças na latência ao estímulo térmico em condições basais. Apesar do *hot plate* e do *tail flick* utilizarem estímulo nocivo térmico para avaliar animais de experimentação, isto pode ter ocorrido devido aos diferentes componentes da circuitaria de dor que podem ser aferidos por estes aparatos. É importante ressaltar que o teste da placa quente, exige do animal uma resposta comportamental complexa (lamber a pata traseira), enquanto que o calor nocivo aplicado na cauda produz uma simples resposta reflexa nociceptiva (afastamento da cauda da fonte de calor) (Bannon & Malmberg, 2007). Assim, a resposta nociceptiva exigida pela placa quente envolve componentes supraespinhais, incluindo estruturas cerebrais responsáveis pela dor afetivo-motivacional (i.e. córtex cingulado anterior), visto que a placa quente produz um

estado de dor aguda em um cenário em que o animal não consegue escapar do estímulo (Yi et al., 2014). Diferentemente, a resposta ao tail flick pode envolver somente medula espinhal (arco reflexo) (Bannon & Malmberg, 2007).

Assim, baseado nos resultados obtidos, sugere-se que a medula espinhal da PMH deve ter sido estruturalmente e funcionalmente comprometida pela carência dos hormônios tireoideanos maternos no período intrauterino. No entanto, não é possível descartar a possibilidade de estruturas supraespinhais terem sido afetadas na prole, em decorrência do hipotireoidismo gestacional experimental, uma vez que aqui, os animais foram avaliados por meio de um aparato comportamental. Estudos morfológicos e de biologia molecular podem auxiliar a identificar alterações nas estruturas supraespinhais importantes para o controle nociceptivo (i.e. bulbo rostro ventrolateral [RVM], substância cinzenta periaquedutal [PAG], lócus coeruleus [LC], córtex cingulado anterior [ACC]) na prole, secundárias a da redução no aporte de TT3 e TT4 materno.

Teste comportamental para avaliação do sistema opioidérgico com agonista de receptores opióides (morfina)

Uma forma importante de se avaliar alterações nas concentrações de determinados neurotransmissores e/ou receptores nas estruturas que compõem o circuito de dor, é tratar os animais, aguda ou cronicamente, com drogas específicas. Drogas estas que alterem as concentrações de neurotransmissores importantes na resposta de dor ou que sejam agonistas ou antagonistas de receptores específicos, seguido da exposição dos animais experimentais ao aparato de avaliação nociceptiva. Neste sentido, este foi o primeiro estudo a avaliar o efeito do HGE no sistema opioidérgico (morfina), serotoninérgico (sertralina), glutamatérgico (memantina) e dopaminérgico/noradrenérgico (AMPT) associado ao comportamento nociceptivo.

A morfina, embora geralmente considerada como um agonista clássico de receptores mu opioides (MOP), também exerce atividade nos outros receptores (receptor delta opioide - DOP e receptor kappa opioide- KOP) (Pathan & Williams, 2012). Centralmente, a substância cinzenta periaquedutal (PAG), olocus ceruleus (LC) e o bulbo rostroventral (RVM) mostram alta concentração de receptores opioides e estes

receptores estão presentes também na substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinhal (Pathan & Williams, 2012). Perifericamente, são encontrados receptores opioides nos terminais pré-sinápticos das fibras A delta e C (Jamison & Mao, 2015; Trescot et al., 2008).

Estudo prévio de Rozisky et al., (2008) mostrou que 5mg/kg i.p. de morfina (alta dose) é capaz de induzir significativa resposta antinociceptiva com 30 e 60 minutos em ratos adolescentes, sendo estes, provavelmente, tempos adequados para avaliar diferenças entre os grupos experimentais. Interessantemente, no presente estudo, nestes dois tempos verificamos menor sensibilidade térmica da PMH quando comparada a PME, após a administração da morfina.

Levando em consideração que os hormônios tireoideanos tem grande importância para o desenvolvimento do sistema nervoso central dos mamíferos (Bernal, 2007, 2005; Calzà et al., 1997) e que os dados prévios do nosso grupo mostraram que filhos de mães hipotireoideas apresentam hiperalgesia térmica ao tail flick ao longo da vida da prole (Alves et al., 2013), isto nos permite sugerir que a carência de HTs no período intrauterino pode ter promovido alterações funcionais e/ou estruturais na circuitaria nociceptiva destes filhotes. Assim, as diferenças observadas entre os grupos experimentais no atual trabalho, evidenciando que filhos de mães com hipotireoidismo apresentam maior analgesia na placa quente, 30 e 60 minutos após a injeção i.p. da morfina, nos permite hipotetizar que pode ter ocorrido uma mudança adaptativa nos circuitos de dor. Compensatoriamente, pode ter havido aumento na expressão de receptores opioides nas estruturas do sistema nervoso central (SNC) (provavelmente medula espinhal) e/ou periférica (gânglios da raiz dorsal) que expressam estes receptores e compõem a circuitaria de controle nociceptivo. Para tanto, estudos futuros devem ser desenvolvidos a fim de quantificar os receptores opioides nestas estruturas (western blotting) nas proles de mães hipo e eutireoideanas.

Teste comportamental para avaliação do sistema seotoninérgico com inibidor pré-sináptico da recaptação da serotonina (sertralina)

Os inibidores da recaptação de serotonina (SSRIs) são compostos por um número considerável de drogas, entre elas a sertralina. SSRIs agem especificamente nas concentrações sinápticas deste neurotransmissor, por meio do bloqueio na recaptação pré-sináptica de serotonina no SNC (Fitzgerald & Bronstein, 2013).

De acordo com revisões sistemáticas, não existe evidência clínica de que os SSRIs, especificamente a sertralina, são superiores ao placebo no tratamento dos sintomas de dor causados pela fibromialgia (Riera, 2015; Walitt et al., 2015) e nem das cefaleias do tipo tensional (Banzi et al., 2015). Experimentalmente, em camundongos, Kesim et al., (2014) evidenciaram que a sertralina (somente na dose de 50 mg/kg e não nas de 10 e 20 mg/kg) produziu efeito analgésico estatisticamente significativo, no tail flick, quando a latência dos animais no tempo 0 (basal) é comparada a latência 30 min após o tratamento agudo com a droga. Como em nossos dados não verificamos diferenças significativas na latência na placa quente entre os grupos experimentais, podemos sugerir que ou o HGE não afetou os circuitos serotoninérgicos ou a dose utilizada foi muito baixa para bloquear a recaptação da serotonina de forma efetiva nos filhotes provenientes do nosso modelo experimental de hipotireoidismo materno. Uma vez que, segundo Kitaichi et al., (2010), uma dose de sertralina de 20 mg/kg em ratos é equivalente a 59 mg/dia em humanos, sendo que a dose clínica de sertralina recomendada é de 50-150 mg/dia (Bauer et al., 2013), podemos sugerir que provavelmente a dose escolhida para o presente estudo, estava abaixo do mínimo recomendado para produzir os efeitos esperados em um circuito que, muito provavelmente, sofreu modificações causadas pelo HGE.

Teste comportamental para avaliação do sistema dopaminérgico/noradrenérgico com inibidor da tirosina hidroxilase (AMPT) e imunofluorescência para tirosina hidroxilase

A norepinefrina (NE) regula antinocicepção através da sua ação sobre α -adrenoreceptores localizados em núcleos cerebrais, medula espinal e órgãos periféricos (Schmitt et al., 1974). Os efeitos da NE na modulação dolorosa são complexos. O papel de NE na dor é dependente do seu local específico de ação no SNC dos subtipos de receptores noradrenérgicos e da duração do estado de dor patológica (Pertovaara, 2006).

Sabe-se que uma série de regiões do cérebro recebem inervação noradrenérgica e exibem expressão de mRNA para α -adrenoreceptores (Jin et al., 2014).

Acrescido a isto, a sinalização da dopamina tem sido mostrada como tendo um importante papel na modulação da dor. Estudos com animais tem evidenciado que a dopamina modula a nocicepção em várias regiões do SNC, incluindo gânglio basal, tálamo, córtex insular e PAG (Jarcho et al., 2012; Wood, 2008). A PAG tem particular interesse por conter uma população de neurônios dopaminérgicos pouco estudados e que tem mostrado ser importante na modulação da dor (Li et al., 2016).

Considerando a importância das catecolaminas para a resposta nociceptiva a utilização de AMPT, um inibidor da tirosina hidroxilase, uma enzima limitante para a biossíntese das catecolaminas (Daubner et al., 2011), torna-se útil a avaliação do papel destes neurotransmissores na resposta nociceptiva na PMH. Até o presente momento, nenhum estudo investigou o papel dos HTs na transmissão catecolaminérgica da dor. Os efeitos do hipotireoidismo gestacional neste circuito na prole também não foi avaliado previamente. Assim, baseado em nossos achados, a carência de HTs maternos parece não afetar o circuito catecolaminérgico de controle nociceptivo, uma vez que não observamos diferenças significativas entre PMH e PME na resposta nociceptiva após inibição da tirosina hidroxilase e nem diferenças na quantificação de neurônios que expressam tirosina hidroxilase na PAG.

No entanto, é importante destacar que o presente estudo avaliou a nocicepção dos animais após a administração sistêmica de uma droga que culmina na redução da catecolaminas circulantes. Assim, os efeitos em outros sistemas podem ter contribuído para a ausência de diferenças nas respostas comportamentais avaliadas (viés de análise). Desta forma, estudos com microinjeção de AMPT no SNC, estudos de biologia molecular e microdiálise podem auxiliar na avaliação mais efetiva do comprometimento gerado pelo HGE nos circuitos catecolaminérgicos da dor na prole.

Teste comportamental para avaliação do sistema glutamatérgico com antagonista de receptor de NMDA (memantina)

O glutamato é o mais importante neurotransmissor utilizado pelos neurônios sensoriais primários para transmitir as informações centralmente e também, potencialmente, para a periferia (Du et al., 2001). Neste sentido, evidências farmacológicas suportam a ideia de que o glutamato desempenha um papel chave na dor aguda e crônica. Kayser et al., (2015) investigaram o efeito deste aminoácido excitatório na nocicepção e, para tanto, utilizaram camundongos modificados geneticamente com deficiência na glutaminase ativada por fosfatase tipo 1 (GLS1), a enzima que sintetiza glutamato nos neurônios glutamatérgicos do SNC. Os autores observaram que os camundongos heterozigotos GLS1+/- apresentaram diminuição de glutamato no SNC e, quando estes foram comparados com o grupo controle, apresentaram maior latência nos testes de nocicepção mecânica (filamentos de von Frey e pressão da cauda) e nos testes de nocicepção térmica (Hargreaves' plantar, imersão da cauda e placa quente). No teste de formalina, os animais heterozigotos também apresentaram diminuição do comportamento nociceptivo (elevar a pata traseira, lambendo a pata traseira e *flinch*) nas duas fases (fase 1: 0 a 5 minutos e fase 2: 16 a 45 minutos).

Baseado nisso, no presente estudo, foi administrado agudamente memantina, um antagonista fraco e não específico de NMDA, nos filhotes de mães hipo e eutireoideas seguido da avaliação da nocicepção térmica supra espinhal na placa quente. A análise dos dados evidenciou significativa analgesia promovida pelo fármaco independente do grupo experimental a que pertenciam os animais. Estes achados estão de acordo com a literatura que ressalta a memantina como uma droga com efeito antinociceptivo/analgésico promissor em ratos e humanos (Ahmad-Sabry & Shareghi, 2015, p.; Berrino et al., 2003; Carlton et al., 1998; Carlton & Hargrett, 1995; Chen et al., 2015; Max et al., 1995; Morel et al., 2016, 2013; Olivan-Blázquez et al., 2014; Qian et al., 1996). No entanto, no presente estudo, após a avaliação da distância percorrida pelos animais no campo aberto, foi possível observar a redução deste parâmetro 30 min após a administração da memantina independente do grupo experimental. Desta forma, é possível que o efeito observado na placa quente (analgesia após memantina, independente do grupo) seja decorrente da alteração motora promovida pela droga. Neste contexto, os dados da correlação, que incluem a distância percorrida como covariável, reforçam que a alteração motora potencialmente justifica a redução da latência observada.

Corroborando os nossos achados, outro estudo evidenciou que a memantina, em alta dose (10 e 20 mg/kg) produziu forte distúrbio motor em ratas fêmeas, o qual foi expresso com hipoatividade 10 min depois da aplicação da memantina (10 e 20 mg/kg) e hiperatividade aos 90 minutos depois da administração da droga (Creeley et al., 2006). Contrariamente, Wesierska et al., (2013) mostraram que ratos machos apresentaram aumento da atividade motora 30 min depois da injeção i.p. de memantina (20 mg/kg).

Quantificação de glutamato no líquido

O presente estudo evidenciou redução do conteúdo de glutamato no líquido cefalorraquidiano (LCR) de ratos filhos de mães hipotireoideas, aos 60 DPN, quando estes foram comparados ao grupo controle. Uma vez que, em estudo prévio, foi observado a hiperalgesia térmica no *tail flick*, era esperado observar aumento no conteúdo de glutamato no LCR. No entanto, sobre isso, um aspecto teórico deve ser considerado. Este diz respeito à interação entre os HTs e glutamato no SNC.

Estudos têm mostrado que o hipotireoidismo cirúrgico reduz a liberação de glutamato no cérebro de ratos (Lee et al., 2003; Shuaib et al., 1994). Contrariamente, em humanos, Zhang et al., (2015) mostraram em 18 pacientes hipotireoideos, maior concentração de glutamato no córtex cingulado posterior (avaliado por TE-averaged PRESS at 3T.) Yi et al., (2014) evidenciaram que hipotireidismo induzido por MTZ associado ao perclorato de potássio na água de beber de ratos com 4 semanas promove aumento da transmissão sináptica glutamatérgica e redução da transmissão sináptica gabaérgica no córtex cingulado anterior (ACC), via registro eletrofisiológico (patch-clamp). Os autores acreditam que o aumento da transmissão sináptica glutamatérgica e redução da transmissão sináptica gabaérgica, no ACC, gerada pelo hipotireoidismo, se devam, pelo menos em parte, a componentes pós-sinápticos (aumento da expressão de receptores de glutamato e diminuição da expressão de receptores GABAA). Isto porque, estes mesmos autores mostraram que o hipotireoidismo experimental promove *up-regulation* da subunidade GluR1 do receptor AMPA e da subunidade NR2B do NMDA em neurônios do ACC e *down-regulation* da subunidade $\alpha 2$ dos receptores GABAA nesta estrutura.

Assim, baseado no exposto, não há como descartar a possibilidade do hipotireoidismo materno ter afetado síntese e liberação de glutamato pelos neurônios, bem como a expressão dos receptores de glutamato e GABA no cérebro e medula espinhal. Como já foi observado hiperalgesia térmica ao tail flick na prole de ratas filhas de mães hipotireoideas, em estudo prévio (Alves et al., 2013), é possível que, mesmo em condições de reduzida concentração líquórica de glutamato, um aumento na expressão de receptores (compensatória a redução do glutamato no liquor ou resultado do hipotireoidismo materno) promova aumento da transmissão sináptica glutamatérgica (i.e. na medula espinhal), resultando na hiperalgesia térmica observada no tail flick. Além disso, alterações no conteúdo de GABA e dos receptores e subunidades deste neurotransmissor, precisariam ser investigadas com a finalidade de se avaliar o balanço destes dois sistemas (excitação / inibição), tão importantes para que ocorram adequadas respostas nociceptivas.

Avaliação dos parâmetros oxidativos

Durante o início da vida, muitas condições gestacionais podem representar um importante determinante da saúde dos descendentes futuramente (Perrone et al., 2016). Durante a gravidez normal, os agentes oxidantes e antioxidantes têm muitas funções fisiológicas, que promovem e controlam o destino celular e que desempenham um papel crucial no desenvolvimento normal através de sinalização celular (Buonocore et al., 2002, 2000; Leal et al., 2011). Na ausência de um aumento paralelo na atividade antioxidante, o estresse oxidativo irá resultar na produção excessiva de espécies reativas de oxigênio podendo promover um dano celular considerável, agindo sobre as proteínas, lípidos e DNA (Davies, 2000). Este desequilíbrio pode mudar o curso da gravidez e gerar um efeito cascata que pode programar o indivíduo intraútero e ser a gênese das doenças na vida adulta (Perrone et al., 2016). Neste contexto, Ahmed et al., (2012) identificaram que filhos de mães tratadas com hipotireoidismo durante o período perinatal (DG 10 ao Dia 10 de lactação) apresentaram aumento na peroxidação lipídica, avaliada por TBARS, no cérebro, cerebelo e bulbo. Nossos achados corroboram o que foi visto por estes autores, uma vez que encontramos aumento de peroxidação lipídica

na medula espinhal de filhos de mães induzidas ao hipotireoidismo gestacional exclusivamente no período gestacional.

Evidências crescentes tem mostrado que compostos antioxidantes tem efeitos antinociceptivos em ensaios clínicos (Hussain et al., 2011) e em modelos animais com dor neuropática (Zhao et al., 2014) e dor inflamatória (Sen et al., 2013). Acrescido a isto, recentemente, Peres Klein et al., (2016) sugeriram o envolvimento do estresse oxidativo no modelo de fibromialgia como um possível mecanismo para a fisiopatologia da doença. Uma revisão publicada em 2014 (Nashed et al., 2014) aponta para as várias vias que são afetadas pelo estresse oxidativo no câncer (que ocorre devido ao estado de excessiva proliferação e pelo uso dos quimioterápicos) e que provocam a dor presente nos indivíduos com esta doença.

Neste contexto, é sabido que o estresse oxidativo pode alterar a nocicepção, o que pode causar hiperalgesia com mecanismos oxidantes locais e espinhais (Wang et al., 2004). Similarmente, as espécies reativas de oxigênio, que são formadas como resultado do estresse oxidativo, causado pelo dano tecidual e inflamação, podem aumentar a estimulação de neurônios sensoriais que desempenham um papel na transmissão da dor (Bassett et al., 2010). Mais recentemente, İnanır & Sogut, (2013) identificaram que pacientes com dor lombar aguda e crônica têm concentração sérica significativamente elevada de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, quando comparado ao grupo controle, o que poderia explicar, segundo os autores, a presença de dor observada nestes pacientes.

O *status* tireoideano tem papel importante em afetar a modulação do estresse oxidativo e do sistema de defesa antioxidante (Ahmed et al., 2012). Os animais com hipertireoidismo parecem morrer mais precocemente e na idade avançada mostram uma deficiência de mielinização (Pasquini & Adamo, 1994). Os autores sugeriram que estas mudanças podem ser devido ao dano produzido pelo estresse oxidativo gerado pelo excesso de HTs. Neste contexto, Kumari et al., (2011) evidenciaram um aumento no estresse oxidativo e uma redução nos marcadores do sistema antioxidante em pacientes hipertiroides, com doença de Graves. Adicionalmente, ratos com hipertireoidismo apresentaram aumento do estresse oxidativo (Rahaman et al., 2001) no eritrócito,

coração e fígado (Messarah et al., 2011) e redução das concentrações de glutathione (GSH) no útero (Kong et al., 2015), eritrócito, coração e fígado (Messarah et al., 2011). Messarah et al., (2010) identificaram que, o conteúdo de TBARS estava aumentado no fígado de ratos hipotireoideos.

A peroxidação lipídica tem sido comumente usada como um importante marcador para estresse oxidativo uma vez que ácidos graxos poliinsaturados são particularmente vulneráveis às espécies reativas de oxigênio (ROS) e por isso, os derivados da peroxidação lipídica podem ser facilmente avaliados (Elnakish et al., 2015; Venditti and Di Meo, 2006). Neste contexto, os neurônios e células da glia do SNC, incluindo medula espinhal, são particularmente propensos ao estresse oxidativo e eletrofílico, visto que possuem alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, alta atividade metabólica oxidativa, intensa produção de metabólitos reativos ao oxigênio e relativamente baixa capacidade antioxidante, que os tornam especialmente suscetíveis a peroxidação por ROS (Hall et al., 1992; Hamann et al., 2008).

O estresse oxidativo tem sido associado com hipo e hipertireoidismo (Resch et al., 2002). No entanto, os mecanismos pelos quais ele é gerado nessas duas condições clínicas são diferentes. No caso do hipertireoidismo, isso ocorre por aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e no caso do hipotireoidismo por baixa disponibilidade de antioxidantes (Mancini et al., 2016). É sabido que os HTs influenciam a composição lipídica dos tecidos de ratos e, conseqüentemente, a suscetibilidade ao estresse oxidativo. O aumento das concentrações de HTs modifica a composição dos fosfolípidios da membrana (Bangur et al., 1995), aumentando o grau de insaturação, especialmente nas membranas das mitocôndrias (Gredilla et al., 2001). A insaturação de ácidos graxos torna-os mais suscetíveis ao ataque de radicais livres (Kanner et al., 1987), este efeito resulta em aumento da peroxidação lipídica nas mitocôndrias.(Gredilla et al., 2001). Neste contexto, já foi mostrado, em fígado de ratos que o hipertireoidismo induzido por T3 está associado com os índices alterados de peroxidação lipídica, incluindo níveis elevados de tiobarbitúrico (TBARS) e hidroperóxidos lipídicos que são subprodutos de peroxidação lipídica(Fernández et al., 1985; Venditti et al., 1997,1999; Venditti & Di Meo, 2006).

Assim, levando em consideração a importância dos HTs para susceptibilidade dos tecidos ao estresse oxidativo e sabendo que este pode interferir na resposta à dor dos pacientes com diversas doenças, não há como descartar a possibilidade de que, além dos efeitos da carência dos HTs intraútero, o elevado T3 da prole tenha promovido aumento da peroxidação lipídica na medula espinhal, identificado pelo elevado TBARS. Isto, pelo menos em parte, pode ter sido responsável pela hiperalgesia espinhal (tail flick) observada no trabalho previamente publicado pelo nosso grupo (Alves et al., 2013).

Sabendo que o estresse oxidativo ocorre como resultado de um desbalanço entre aumento na produção e/ou redução da degradação de espécies reativas de oxigênio (Kolberg et al., 2015), ainda é precoce para afirmar que o HGE promove aumento do estresse oxidativo na medula espinhal da PMH, uma vez que ainda é necessário avaliar a atividade antioxidante destes animais.

Portanto, nossos resultados demonstram pela primeira vez que a redução dos HTs, durante exclusivamente a vida intrauterina, pode afetar permanentemente os componentes biológicos da circuitaria nociceptiva, podendo por isso, constituir um elemento etiológico de desordens que atualmente são consideradas de origem desconhecida. Além disso, esse estudo fornece perspectivas para futuros trabalhos com o objetivo de investigar mais mecanismos associados as alterações encontradas na prole proveniente do hipotireoidismo materno.

8.CONCLUSÃO

Assim concluimos que o HGE não afeta a massa corporal, o tempo de gestação e número de filhotes das mães hipotireoideas, no entanto, reduz a massa corporal da prole, promove aumento das concentrações séricas de TT3 dos descendentes das ratas com hipotireoidismo gestacional, existindo a possibilidade de recalibração do *set point* de normalidade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide da prole na vida pós natal. Acrescido a isto, o HGE, associado provavelmente ao alterado *status* tireoideano da prole, altera a resposta nociceptiva na placa quente após injeção da morfina e aumenta a peroxidação lipídica na medula espinhal dos filhos de mães hipotireoideas.

9. PERSPECTIVAS

Este estudo auxilia na geração de conhecimento acerca do substrato neurobiológico das alterações nos mecanismos de nocicepção encontradas nos filhos de mães hipotireóideas. Permitindo o possível desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prevenção e tratamento do hipotireoidismo materno, bem como das afecções decorrentes da deficiência de hormônios tireoideanos maternos durante a vida intrauterina da sua prole.

O presente estudo tem o potencial de fomentar a discussão sobre o estabelecimento de processos/técnicas de monitoramento de hipotireoidismo gestacional, bem como de inserir na rotina pré-natal a obrigatoriedade de diagnóstico da função tireoidiana materna, o que ainda não é mandatório no SUS. Desta forma, podendo prevenir o crescimento da prevalência de algumas das desordens que hoje são de causa desconhecida.

REFERÊNCIAS

- Abuid, J., Larsen, P.R., 1974. Triiodothyronine and thyroxine in hyperthyroidism. Comparison of the acute changes during therapy with antithyroid agents. *J. Clin. Invest.* 54, 201–208. doi:10.1172/JCI107744
- Ackermans, M.T., Klieverik, L.P., Ringeling, P., Endert, E., Kalsbeek, A., Fliers, E., 2010. An online solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to study the presence of thyronamines in plasma and tissue and their putative conversion from 13C6-thyroxine. *J. Endocrinol.* 206, 327–334. doi:10.1677/JOE-10-0060
- Ahmad-Sabry, M.-H., Shareghi, G., 2015. EFFECTS OF MEMANTINE ON PAIN IN PATIENTS WITH COMPLEX REGIONAL PAIN SYNDROME--A RETROSPECTIVE STUDY. *Middle East J. Anaesthesiol.* 23, 51–54.
- Ahmed, I.Z., Eid, Y.M., El Orabi, H., Ibrahim, H.R., 2014. Comparison of universal and targeted screening for thyroid dysfunction in pregnant Egyptian women. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 171, 285–291. doi:10.1530/EJE-14-0100
- Ahmed, M.M., Hoshino, H., Chikuma, T., Yamada, M., Kato, T., 2004. Effect of memantine on the levels of glial cells, neuropeptides, and peptide-degrading enzymes in rat brain regions of ibotenic acid-treated alzheimer's disease model. *Neuroscience* 126, 639–649. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.04.024
- Ahmed, O.M., Abd El-Tawab, S.M., Ahmed, R.G., 2010. Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones-neurotransmitters and adenosinergic system interactions. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 28, 437–454. doi:10.1016/j.ijdevneu.2010.06.007
- Ahmed, O.M., Abd El-Tawab, S.M., Ahmed, R.G., 2010. Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones-neurotransmitters and adenosinergic system interactions. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 28, 437–454. doi:10.1016/j.ijdevneu.2010.06.007
- Ahmed, O.M., Ahmed, R.G., El-Gareib, A.W., El-Bakry, A.M., Abd El-Tawab, S.M., 2012. Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: II-the developmental pattern of neurons in relation to oxidative stress and antioxidant defense system. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 30, 517–537. doi:10.1016/j.ijdevneu.2012.04.005
- Aires M, 2008. *Fisiologia*. Guanabara Koogan.
- Ajmani, S.N., Aggarwal, D., Bhatia, P., Sharma, M., Sarabhai, V., Paul, M., 2014. Prevalence of overt and subclinical thyroid dysfunction among pregnant women and its effect on maternal and fetal outcome. *J. Obstet. Gynaecol. India* 64, 105–110. doi:10.1007/s13224-013-0487-y
- Akaike, M., Kato, N., Ohno, H., Kobayashi, T., 1991. Hyperactivity and spatial maze learning impairment of adult rats with temporary neonatal hypothyroidism. *Neurotoxicol. Teratol.* 13, 317–322.
- Albornoz, E.A., Carreño, L.J., Cortes, C.M., Gonzalez, P.A., Cisternas, P.A., Cautivo, K.M., Catalán, T.P., Opazo, M.C., Eugenin, E.A., Berman, J.W., Bueno, S.M., Kalergis, A.M., Riedel, C.A., 2013. Gestational hypothyroidism increases the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in adult offspring. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 23, 1627–1637. doi:10.1089/thy.2012.0401
- Alhaider, A.A., Wilcox, G.L., 1993. Differential roles of 5-hydroxytryptamine1A and 5-hydroxytryptamine1B receptor subtypes in modulating spinal nociceptive transmission in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 378–385.

- Alkemade, A., Friesema, E.C., Unmehopa, U.A., Fabriek, B.O., Kuiper, G.G., Leonard, J.L., Wiersinga, W.M., Swaab, D.F., Visser, T.J., Fliers, E., 2005. Neuroanatomical pathways for thyroid hormone feedback in the human hypothalamus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 4322–4334. doi:10.1210/jc.2004-2567
- Alkemade, A., Friesema, E.C.H., Kalsbeek, A., Swaab, D.F., Visser, T.J., Fliers, E., 2011. Expression of thyroid hormone transporters in the human hypothalamus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E967–971. doi:10.1210/jc.2010-2750
- Allan, W.C., Haddow, J.E., Palomaki, G.E., Williams, J.R., Mitchell, M.L., Hermos, R.J., Faix, J.D., Klein, R.Z., 2000. Maternal thyroid deficiency and pregnancy complications: implications for population screening. *J. Med. Screen.* 7, 127–130.
- Altun, A., Yildirim, K., Ozdemir, E., Bagcivan, I., Gursoy, S., Durmus, N., 2015. Attenuation of morphine antinociceptive tolerance by cannabinoid CB1 and CB2 receptor antagonists. *J. Physiol. Sci. JPS* 65, 407–415. doi:10.1007/s12576-015-0379-2
- Alves, I.G.N., da Cruz, K.M.L., Mota, C.M.D., de Santana, D.S., Gaujac, D.P., de Carvalho, V.C.B., Reis, L.C., Sluka, K.A., Quintans-Junior, L.J., Antonioli, A.R., Desantana, J.M., Badauê-Passos, D., Jr, de Santana-Filho, V.J., 2013. Experimental hypothyroidism during pregnancy affects nociception and locomotor performance of offspring in rats. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* doi:10.1002/j.1532-2149.2013.00306.x
- American College of Obstetricians and Gynecologists, 2015. Practice Bulletin No. 148: Thyroid disease in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 125, 996–1005. doi:10.1097/01.AOG.0000462945.27539.93
- Amouzegar, A., Mehran, L., Sarvghadi, F., Delshad, H., Azizi, F., Lazarus, J.H., 2014. Comparison of the American Thyroid Association with the Endocrine Society practice guidelines for the screening and treatment of hypothyroidism during pregnancy. *Horm. Athens Greece* 13, 307–313.
- Andersen, S.L., Olsen, J., Laurberg, P., 2016. Hypothyroidism and pregnancy loss: comparison with hyperthyroidism and diabetes in a Danish population-based study. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. doi:10.1111/cen.13136
- Andersen, S.L., Olsen, J., Wu, C.S., Laurberg, P., 2013. Low Birth Weight in Children Born to Mothers with Hyperthyroidism and High Birth Weight in Hypothyroidism, whereas Preterm Birth Is Common in Both Conditions: A Danish National Hospital Register Study. *Eur. Thyroid J.* 2, 135–144. doi:10.1159/000350513
- Andrew, D., Greenspan, J.D., 1999. Peripheral coding of tonic mechanical cutaneous pain: comparison of nociceptor activity in rat and human psychophysics. *J. Neurophysiol.* 82, 2641–2648.
- Antunes-Rodrigues, 2005. *Neuroendocrinologia: Básica e Aplicada*. Guanabara Koogan.
- Anzai, R., Adachi, M., Sho, N., Muroya, K., Asakura, Y., Onigata, K., 2012. Long-term 3,5,3'-triiodothyroacetic acid therapy in a child with hyperthyroidism caused by thyroid hormone resistance: pharmacological study and therapeutic recommendations. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 22, 1069–1075. doi:10.1089/thy.2011.0450
- Aracava, Y., Pereira, E.F.R., Maelicke, A., Albuquerque, E.X., 2005. Memantine blocks alpha7* nicotinic acetylcholine receptors more potently than n-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampal neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 1195–1205. doi:10.1124/jpet.104.077172
- Araujo, R.L., Carvalho, D.P., 2011. Bioenergetic impact of tissue-specific regulation of iodothyronine deiodinases during nutritional imbalance. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 59–65. doi:10.1007/s10863-011-9327-x
- Arrojo E Drigo, R., Bianco, A.C., 2011. Type 2 deiodinase at the crossroads of thyroid hormone action. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1432–1441. doi:10.1016/j.biocel.2011.05.016

- Arrojo E Drigo, R., Egri, P., Jo, S., Gereben, B., Bianco, A.C., 2013a. The type II deiodinase is retrotranslocated to the cytoplasm and proteasomes via p97/Atx3 complex. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 27, 2105–2115. doi:10.1210/me.2013-1281
- Arrojo E Drigo, R., Fonseca, T.L., Werneck-de-Castro, J.P.S., Bianco, A.C., 2013b. Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3956–3964. doi:10.1016/j.bbagen.2012.08.019
- Astapova, I., Hollenberg, A.N., 2013. The in vivo role of nuclear receptor corepressors in thyroid hormone action. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3876–3881. doi:10.1016/j.bbagen.2012.07.001
- Ausó, E., Lavado-Autric, R., Cuevas, E., Del Rey, F.E., Morreale De Escobar, G., Berbel, P., 2004. A moderate and transient deficiency of maternal thyroid function at the beginning of fetal neocortico-genesis alters neuronal migration. *Endocrinology* 145, 4037–4047. doi:10.1210/en.2004-0274
- Ballabio, M., Nicolini, U., Jowett, T., Ruiz de Elvira, M.C., Ekins, R.P., Rodeck, C.H., 1989. Maturation of thyroid function in normal human foetuses. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 31, 565–571.
- Ballı, M., Çetin, M., Taşolar, H., Uysal, O.K., Yılmaz, M., Durukan, M., Elbasan, Z., Çaylı, M., 2016. The relationship between serum thyroid hormone levels, subclinical hypothyroidism, and coronary collateral circulation in patients with stable coronary artery disease. *Türk Kardiyol. Derneği Arş. Türk Kardiyol. Derneğinin Yayın Organıdır* 44, 130–136.
- Bangur, C.S., Howland, J.L., Katyare, S.S., 1995. Thyroid hormone treatment alters phospholipid composition and membrane fluidity of rat brain mitochondria. *Biochem. J.* 305 (Pt 1), 29–32.
- Bannon, A.W., Malmberg, A.B., 2007. Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr. Protoc. Neurosci.* Editor. Board Jacqueline N Crawley AI Chapter 8, Unit 8.9. doi:10.1002/0471142301.ns0809s41
- Banzi, R., Cusi, C., Randazzo, C., Sterzi, R., Tedesco, D., Moja, L., 2015. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) for the prevention of tension-type headache in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 5, CD011681. doi:10.1002/14651858.CD011681
- Baqui, M., Botero, D., Gereben, B., Curcio, C., Harney, J.W., Salvatore, D., Sorimachi, K., Larsen, P.R., Bianco, A.C., 2003. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *J. Biol. Chem.* 278, 1206–1211. doi:10.1074/jbc.M210266200
- Baqui, M.M., Gereben, B., Harney, J.W., Larsen, P.R., Bianco, A.C., 2000. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology* 141, 4309–4312. doi:10.1210/endo.141.11.7872
- Barbaresi, P., Quaranta, A., Amoroso, S., Mensà, E., Fabri, M., 2012. Immunocytochemical localization of calretinin-containing neurons in the rat periaqueductal gray and colocalization with enzymes producing nitric oxide: a double, double-labeling study. *Synap. N. Y. N* 66, 291–307. doi:10.1002/syn.21509
- Barbaro, N.M., Heinricher, M.M., Fields, H.L., 1986. Putative pain modulating neurons in the rostral ventral medulla: reflex-related activity predicts effects of morphine. *Brain Res.* 366, 203–210.
- Barker, D.J., Osmond, C., Law, C.M., 1989. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. *J. Epidemiol. Community Health* 43, 237–240.

- Basbaum, A.I., 1981. Descending control of pain transmission: possible serotonergic-enkephalinergic interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 133, 177–189.
- Basbaum, A.I., Fields, H.L., 1984. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.* 7, 309–338.
doi:10.1146/annurev.ne.07.030184.001521
- Bassett, J.H.D., Boyde, A., Howell, P.G.T., Bassett, R.H., Galliford, T.M., Archanco, M., Evans, H., Lawson, M.A., Croucher, P., St Germain, D.L., Galton, V.A., Williams, G.R., 2010. Optimal bone strength and mineralization requires the type 2 iodothyronine deiodinase in osteoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7604–7609.
doi:10.1073/pnas.0911346107
- Bassett, J.H.D., Williams, G.R., 2016. Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance. *Endocr. Rev.* 37, 135–187. doi:10.1210/er.2015-1106
- Bassett, J.H.D., Williams, G.R., 2008. Critical role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bone. *Bone* 43, 418–426. doi:10.1016/j.bone.2008.05.007
- Bauer, M., Pfennig, A., Severus, E., Whybrow, P.C., Angst, J., Möller, H.-J., World Federation of Societies of Biological Psychiatry. Task Force on Unipolar Depressive Disorders, 2013. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) guidelines for biological treatment of unipolar depressive disorders, part 1: update 2013 on the acute and continuation treatment of unipolar depressive disorders. *World J. Biol. Psychiatry Off. J. World Fed. Soc. Biol. Psychiatry* 14, 334–385. doi:10.3109/15622975.2013.804195
- Bederson, J.B., Fields, H.L., Barbaro, N.M., 1990. Hyperalgesia during naloxone-precipitated withdrawal from morphine is associated with increased on-cell activity in the rostral ventromedial medulla. *Somatosens. Mot. Res.* 7, 185–203.
- Behzadi, G., Ganji, F., 2005. Morphological alteration in oro-facial CGRP containing motoneurons due to congenital thyroid hypofunction. *Peptides* 26, 1486–1491.
doi:10.1016/j.peptides.2005.03.053
- Benarroch, E.E., Schmeichel, A.M., Low, P.A., Parisi, J.E., 2010. Differential involvement of the periaqueductal gray in multiple system atrophy. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 158, 111–117. doi:10.1016/j.autneu.2010.07.009
- Benhadi, N., Wiersinga, W.M., Reitsma, J.B., Vrijkotte, T.G.M., Bonsel, G.J., 2009. Higher maternal TSH levels in pregnancy are associated with increased risk for miscarriage, fetal or neonatal death. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 160, 985–991.
doi:10.1530/EJE-08-0953
- Berbel, P., Ausó, E., García-Velasco, J.V., Molina, M.L., Camacho, M., 2001. Role of thyroid hormones in the maturation and organisation of rat barrel cortex. *Neuroscience* 107, 383–394.
- Berbel, P., Guadaño-Ferraz, A., Angulo, A., Ramón Cerezo, J., 1994. Role of thyroid hormones in the maturation of interhemispheric connections in rats. *Behav. Brain Res.* 64, 9–14.
- Bergh, J.J., Lin, H.-Y., Lansing, L., Mohamed, S.N., Davis, F.B., Mousa, S., Davis, P.J., 2005. Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146, 2864–2871. doi:10.1210/en.2005-0102
- Bernal, J., 2007. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 3, 249–259. doi:10.1038/ncpendmet0424
- Bernal, J., 2005. Thyroid hormones and brain development. *Vitam. Horm.* 71, 95–122.
doi:10.1016/S0083-6729(05)71004-9
- Berrino, L., Oliva, P., Massimo, F., Aurilio, C., Maione, S., Grella, A., Rossi, F., 2003. Antinociceptive effect in mice of intraperitoneal N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in the formalin test. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 7, 131–137.
doi:10.1016/S1090-3801(02)00086-1

- Besson, J.M., 1999. The neurobiology of pain. *Lancet Lond. Engl.* 353, 1610–1615.
- Bianco, A.C., 2011. Minireview: cracking the metabolic code for thyroid hormone signaling. *Endocrinology* 152, 3306–3311. doi:10.1210/en.2011-1104
- Bianco, A.C., 2004. Triplets! Unexpected structural similarity among the three enzymes that catalyze initiation and termination of thyroid hormone effects. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 48, 16–24. doi:S0004-27302004000100004
- Bianco, A.C., Kim, B.W., 2006a. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* 116, 2571–2579. doi:10.1172/JCI29812
- Bianco, A.C., Kim, B.W., 2006b. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* 116, 2571–2579. doi:10.1172/JCI29812
- Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., Larsen, P.R., 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23, 38–89. doi:10.1210/edrv.23.1.0455
- Bizhanova, A., Kopp, P., 2011. Controversies concerning the role of pendrin as an apical iodide transporter in thyroid follicular cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 28, 485–490. doi:10.1159/000335103
- Bizhanova, A., Kopp, P., 2009. Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology* 150, 1084–1090. doi:10.1210/en.2008-1437
- Blatt, A.J., Nakamoto, J.M., Kaufman, H.W., 2012. National status of testing for hypothyroidism during pregnancy and postpartum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 777–784. doi:10.1210/jc.2011-2038
- Blazer, S., Moreh-Waterman, Y., Miller-Lotan, R., Tamir, A., Hochberg, Z., 'ev, 2003. Maternal hypothyroidism may affect fetal growth and neonatal thyroid function. *Obstet. Gynecol.* 102, 232–241.
- Bobinski, F., Ferreira, T.A.A., Córdova, M.M., Dombrowski, P.A., da Cunha, C., Santo, C.C. do E., Poli, A., Pires, R.G.W., Martins-Silva, C., Sluka, K.A., Santos, A.R.S., 2015. Role of brainstem serotonin in analgesia produced by low-intensity exercise on neuropathic pain after sciatic nerve injury in mice. *Pain* 156, 2595–2606. doi:10.1097/j.pain.0000000000000372
- Bose, R., Sutherland, G.R., Pinsky, C., 1989. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. *Neurochem. Res.* 14, 217–220.
- Botero, D., Gereben, B., Goncalves, C., De Jesus, L.A., Harney, J.W., Bianco, A.C., 2002. Ubc6p and ubc7p are required for normal and substrate-induced endoplasmic reticulum-associated degradation of the human selenoprotein type 2 iodothyronine monodeiodinase. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 16, 1999–2007. doi:10.1210/me.2002-0135
- Bradley, D.J., Towle, H.C., Young, W.S., 1992. Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 2288–2302.
- Braun, D., Kinne, A., Bräuer, A.U., Sapin, R., Klein, M.O., Köhrle, J., Wirth, E.K., Schweizer, U., 2011a. Developmental and cell type-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse brain and in primary brain cells. *Glia* 59, 463–471. doi:10.1002/glia.21116
- Braun, D., Wirth, E.K., Wohlgemuth, F., Reix, N., Klein, M.O., Grüters, A., Köhrle, J., Schweizer, U., 2011b. Aminoaciduria, but normal thyroid hormone levels and signalling, in mice lacking the amino acid and thyroid hormone transporter Slc7a8. *Biochem. J.* 439, 249–255. doi:10.1042/BJ20110759

- Brenchat, A., Romero, L., García, M., Pujol, M., Burgueño, J., Torrens, A., Hamon, M., Baeyens, J.M., Buschmann, H., Zamanillo, D., Vela, J.M., 2009. 5-HT7 receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice. *Pain* 141, 239–247. doi:10.1016/j.pain.2008.11.009
- Brent, G.A., 2012. Mechanisms of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* 122, 3035–3043. doi:10.1172/JCI60047
- Brenta, G., Vaisman, M., Sgarbi, J.A., Bergoglio, L.M., Andrada, N.C. de, Bravo, P.P., Orlandi, A.M., Graf, H., 2013. Clinical practice guidelines for the management of hypothyroidism. *Arq. Bras. Endocrinol. Amp Metabol.* 57, 265–291. doi:10.1590/S0004-27302013000400003
- Brosvic, G.M., Taylor, J.N., Dihoff, R.E., 2002. Influences of early thyroid hormone manipulations: delays in pup motor and exploratory behavior are evident in adult operant performance. *Physiol. Behav.* 75, 697–715.
- Brucker-Davis, F., Skarulis, M.C., Grace, M.B., Benichou, J., Hauser, P., Wiggs, E., Weintraub, B.D., 1995. Genetic and clinical features of 42 kindreds with resistance to thyroid hormone. The National Institutes of Health Prospective Study. *Ann. Intern. Med.* 123, 572–583.
- Buonocore, G., Perrone, S., Longini, M., Terzuoli, L., Bracci, R., 2000. Total hydroperoxide and advanced oxidation protein products in preterm hypoxic babies. *Pediatr. Res.* 47, 221–224.
- Buonocore, G., Perrone, S., Longini, M., Vezzosi, P., Marzocchi, B., Paffetti, P., Bracci, R., 2002. Oxidative stress in preterm neonates at birth and on the seventh day of life. *Pediatr. Res.* 52, 46–49. doi:10.1203/00006450-200207000-00010
- Burns, R., O’Herlihy, C., Smyth, P.P.A., 2011. The placenta as a compensatory iodine storage organ. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 21, 541–546. doi:10.1089/thy.2010.0203
- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., Thompson, W.J., Barres, B.A., 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 264–278. doi:10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008
- Calil-Silveira, J., Serrano-Nascimento, C., Kopp, P., Nunes, M.T., 2016. Iodide excess regulates its own efflux: a possible involvement of pendrin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* ajpcell.00210.2015. doi:10.1152/ajpcell.00210.2015
- Calvino, B., Grilo, R.M., 2006. Central pain control. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* 73, 10–16. doi:10.1016/j.jbspin.2004.11.006
- Calvo, R., Obregón, M.J., Ruiz de Oña, C., Escobar del Rey, F., Morreale de Escobar, G., 1990. Congenital hypothyroidism, as studied in rats. Crucial role of maternal thyroxine but not of 3,5,3’-triiodothyronine in the protection of the fetal brain. *J. Clin. Invest.* 86, 889–899. doi:10.1172/JCI114790
- Calvo, R.M., Jauniaux, E., Gulbis, B., Asunción, M., Gervy, C., Contempré, B., Morreale de Escobar, G., 2002. Fetal tissues are exposed to biologically relevant free thyroxine concentrations during early phases of development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1768–1777. doi:10.1210/jcem.87.4.8434
- Calzà, L., Aloe, L., Giardino, L., 1997. Thyroid hormone-induced plasticity in the adult rat brain. *Brain Res. Bull.* 44, 549–557.
- Campbell, I., 2011. Thyroid and parathyroid hormones and calcium homeostasis. *Anaesth. Intensive Care Med.* 12, 465–468. doi:10.1016/j.mpaic.2011.07.003
- Campbell, I., 2005. Thyroid and parathyroid hormones and calcium homeostasis. *Anaesth. Intensive Care Med.* 6, 333–336. doi:10.1383/anes.2005.6.10.333

- Carlton, S.M., Hargett, G.L., 1995. Treatment with the NMDA antagonist memantine attenuates nociceptive responses to mechanical stimulation in neuropathic rats. *Neurosci. Lett.* 198, 115–118.
- Carlton, S.M., Rees, H., Tsuruoka, M., Willis, W.D., 1998. Memantine attenuates responses of spinothalamic tract cells to cutaneous stimulation in neuropathic monkeys. *Eur. J. Pain* 2, 229–238. doi:10.1016/S1090-3801(98)90019-2
- Carmichael, S.L., Ma, C., Rasmussen, S.A., Cunningham, M.L., Browne, M.L., Dosiou, C., Lammer, E.J., Shaw, G.M., 2015. Craniosynostosis and risk factors related to thyroid dysfunction. *Am. J. Med. Genet. A.* 167A, 701–707. doi:10.1002/ajmg.a.36953
- Carvalho, D.P., Dupuy, C., 2013. Role of the NADPH Oxidases DUOX and NOX4 in Thyroid Oxidative Stress. *Eur. Thyroid J.* 2, 160–167. doi:10.1159/000354745
- Casey, B.M., Dashe, J.S., Spong, C.Y., McIntire, D.D., Leveno, K.J., Cunningham, G.F., 2007. Perinatal significance of isolated maternal hypothyroxinemia identified in the first half of pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 109, 1129–1135. doi:10.1097/01.AOG.0000262054.03531.24
- Cathy M. Russo, and William G. Brose, M., 1998. Chronic Pain. *Annu. Rev. Med.* 49, 123–133. doi:10.1146/annurev.med.49.1.123
- Ceballos, A., Belinchon, M.M., Sanchez-Mendoza, E., Grijota-Martinez, C., Dumitrescu, A.M., Refetoff, S., Morte, B., Bernal, J., 2009a. Importance of monocarboxylate transporter 8 for the blood-brain barrier-dependent availability of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 150, 2491–2496. doi:10.1210/en.2008-1616
- Ceballos, A., Belinchon, M.M., Sanchez-Mendoza, E., Grijota-Martinez, C., Dumitrescu, A.M., Refetoff, S., Morte, B., Bernal, J., 2009b. Importance of monocarboxylate transporter 8 for the blood-brain barrier-dependent availability of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 150, 2491–2496. doi:10.1210/en.2008-1616
- Chan, S., Rovet, J., 2003. THYROID HORMONES IN FETAL CENTRAL NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT. *Fetal Matern. Med. Rev.* 14, 177–208. doi:10.1017/S0965539503001086
- Chan, S.-Y., Franklyn, J.A., Pemberton, H.N., Bulmer, J.N., Visser, T.J., McCabe, C.J., Kilby, M.D., 2006. Monocarboxylate transporter 8 expression in the human placenta: the effects of severe intrauterine growth restriction. *J. Endocrinol.* 189, 465–471. doi:10.1677/joe.1.06582
- Chan, S.Y., Vasilopoulou, E., Kilby, M.D., 2009. The role of the placenta in thyroid hormone delivery to the fetus. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 5, 45–54. doi:10.1038/ncpendmet1026
- Chang, D.L.F., Pearce, E.N., 2013. Screening for maternal thyroid dysfunction in pregnancy: a review of the clinical evidence and current guidelines. *J. Thyroid Res.* 2013, 851326. doi:10.1155/2013/851326
- Chawla, R., Alden, T.D., Bizhanova, A., Kadakia, R., Brickman, W., Kopp, P.A., 2015. Squamosal Suture Craniosynostosis Due to Hyperthyroidism Caused by an Activating Thyrotropin Receptor Mutation (T632I). *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 25, 1167–1172. doi:10.1089/thy.2014.0503
- Chen, C., Zhou, Z., Zhong, M., Zhang, Y., Li, M., Zhang, L., Qu, M., Yang, J., Wang, Y., Yu, Z., 2012. Thyroid hormone promotes neuronal differentiation of embryonic neural stem cells by inhibiting STAT3 signaling through TR α 1. *Stem Cells Dev.* 21, 2667–2681. doi:10.1089/scd.2012.0023
- Chen, F.-L., Dong, Y.-L., Zhang, Z.-J., Cao, D.-L., Xu, J., Hui, J., Zhu, L., Gao, Y.-J., 2012. Activation of astrocytes in the anterior cingulate cortex contributes to the affective component of pain in an inflammatory pain model. *Brain Res. Bull.* 87, 60–66. doi:10.1016/j.brainresbull.2011.09.022

- Chen, H., Lin, R.J., Xie, W., Wilpitz, D., Evans, R.M., 1999. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell* 98, 675–686.
- Chen, J., Wei, Q., Yao, J., Qian, X., Dai, Y., Yang, Y., Cao, X., Gao, X., 2013. Identification of two heterozygous deafness mutations in SLC26A4 (PDS) in a Chinese family with two siblings. *Int. J. Audiol.* 52, 134–138. doi:10.3109/14992027.2012.723142
- Chen, L.-M., Du, W.-J., Dai, J., Zhang, Q., Si, G.-X., Yang, H., Ye, E.-L., Chen, Q.-S., Yu, L.-C., Zhang, C., Lu, X.-M., 2014. Effects of subclinical hypothyroidism on maternal and perinatal outcomes during pregnancy: a single-center cohort study of a Chinese population. *PloS One* 9, e109364. doi:10.1371/journal.pone.0109364
- Chen, Y.-W., Chiu, C.-C., Liu, K.-S., Hung, C.-H., Wang, J.-J., 2015. Memantine elicits spinal blockades of motor function, proprioception, and nociception in rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 29, 567–574. doi:10.1111/fcp.12142
- Cheng, S.Y., 2000. Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 1, 9–18.
- Cheng, S.-Y., Leonard, J.L., Davis, P.J., 2010. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr. Rev.* 31, 139–170. doi:10.1210/er.2009-0007
- Chiellini, G., Frascarelli, S., Ghelardoni, S., Carnicelli, V., Tobias, S.C., DeBarber, A., Brogioni, S., Ronca-Testoni, S., Cerbai, E., Grandy, D.K., Scanlan, T.S., Zucchi, R., 2007. Cardiac effects of 3-iodothyronamine: a new aminergic system modulating cardiac function. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 1597–1608. doi:10.1096/fj.06-7474com
- Christensen, E.I., Birn, H., 2002. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 256–266. doi:10.1038/nrm778
- Chung, H.R., 2014. Adrenal and thyroid function in the fetus and preterm infant. *Korean J. Pediatr.* 57, 425–433. doi:10.3345/kjp.2014.57.10.425
- Clark, F.M., Proudfit, H.K., 1992. Anatomical evidence for genetic differences in the innervation of the rat spinal cord by noradrenergic locus coeruleus neurons. *Brain Res.* 591, 44–53.
- Clark, F.M., Proudfit, H.K., 1991. The projection of locus coeruleus neurons to the spinal cord in the rat determined by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *Brain Res.* 538, 231–245.
- Cleary-Goldman, J., Malone, F.D., Lambert-Messerlian, G., Sullivan, L., Canick, J., Porter, T.F., Luthy, D., Gross, S., Bianchi, D.W., D'Alton, M.E., 2008. Maternal thyroid hypofunction and pregnancy outcome. *Obstet. Gynecol.* 112, 85–92. doi:10.1097/AOG.0b013e3181788dd7
- Cody, V., Davis, P.J., Davis, F.B., 2007. Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with alpha v beta 3 integrin. *Steroids* 72, 165–170. doi:10.1016/j.steroids.2006.11.008
- Coizet, V., Dommett, E.J., Klop, E.M., Redgrave, P., Overton, P.G., 2010. The parabrachial nucleus is a critical link in the transmission of short latency nociceptive information to midbrain dopaminergic neurons. *Neuroscience* 168, 263–272. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.03.049
- Contempré, B., Jauniaux, E., Calvo, R., Jurkovic, D., Campbell, S., de Escobar, G.M., 1993. Detection of thyroid hormones in human embryonic cavities during the first trimester of pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1719–1722. doi:10.1210/jcem.77.6.8263162
- Craig, A.D., 1995. Distribution of brainstem projections from spinal lamina I neurons in the cat and the monkey. *J. Comp. Neurol.* 361, 225–248. doi:10.1002/cne.903610204
- Creeley, C., Wozniak, D.F., Labruyere, J., Taylor, G.T., Olney, J.W., 2006. Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 3923–3932. doi:10.1523/JNEUROSCI.4883-05.2006

- Curcio-Morelli, C., Zavacki, A.M., Christofollete, M., Gereben, B., de Freitas, B.C.G., Harney, J.W., Li, Z., Wu, G., Bianco, A.C., 2003. Deubiquitination of type 2 iodothyronine deiodinase by von Hippel-Lindau protein-interacting deubiquitinating enzymes regulates thyroid hormone activation. *J. Clin. Invest.* 112, 189–196. doi:10.1172/JCI18348
- Danzi, S., Klein, I., 2014. Thyroid disease and the cardiovascular system. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 43, 517–528. doi:10.1016/j.ecl.2014.02.005
- Darras, V.M., Houbrechts, A.M., Van Herck, S.L.J., 2015. Intracellular thyroid hormone metabolism as a local regulator of nuclear thyroid hormone receptor-mediated impact on vertebrate development. *Biochim. Biophys. Acta* 1849, 130–141. doi:10.1016/j.bbagr.2014.05.004
- Darras, V.M., Houbrechts, A.M., Van Herck, S.L.J., 2014. Intracellular thyroid hormone metabolism as a local regulator of nuclear thyroid hormone receptor-mediated impact on vertebrate development. *Biochim. Biophys. Acta*. doi:10.1016/j.bbagr.2014.05.004
- Darras, V.M., Van Herck, S.L.J., 2012. Iodothyronine deiodinase structure and function: from ascidians to humans. *J. Endocrinol.* 215, 189–206. doi:10.1530/JOE-12-0204
- Daubner, S.C., Le, T., Wang, S., 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 1–12. doi:10.1016/j.abb.2010.12.017
- Davies, K.J., 2000. An overview of oxidative stress. *IUBMB Life* 50, 241–244. doi:10.1080/713803723
- Davis, F.B., Tang, H.-Y., Shih, A., Keating, T., Lansing, L., Hercbergs, A., Fenstermaker, R.A., Mousa, A., Mousa, S.A., Davis, P.J., Lin, H.-Y., 2006. Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer Res.* 66, 7270–7275. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4365
- Davis, P.J., Davis, F.B., 2002. Nongenomic Actions of Thyroid Hormone on the Heart. *Thyroid* 12, 459–466. doi:10.1089/105072502760143827
- Davis, P.J., Davis, F.B., Mousa, S.A., Luidens, M.K., Lin, H.-Y., 2011. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 99–115. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010510-100512
- Davis, P.J., Goglia, F., Leonard, J.L., 2016. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 111–121. doi:10.1038/nrendo.2015.205
- Davis, P.J., Leonard, J.L., Davis, F.B., 2008. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 211–218. doi:10.1016/j.yfrne.2007.09.003
- De Deken, X., Wang, D., Many, M.C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J.E., Miot, F., 2000. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.* 275, 23227–23233. doi:10.1074/jbc.M000916200
- De Groot, L., Abalovich, M., Alexander, E.K., Amino, N., Barbour, L., Cobin, R.H., Eastman, C.J., Lazarus, J.H., Luton, D., Mandel, S.J., Mestman, J., Rovet, J., Sullivan, S., 2012. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 2543–2565. doi:10.1210/jc.2011-2803
- De Nayer, P., Cornette, C., Vanderschueren, M., Eggermont, E., Devlieger, H., Jaeken, J., Beckers, C., 1984. Serum thyroglobulin levels in preterm neonates. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 21, 149–153.
- De Vito, P., Balducci, V., Leone, S., Percario, Z., Mangino, G., Davis, P.J., Davis, F.B., Affabris, E., Luly, P., Pedersen, J.Z., Incerpi, S., 2012. Nongenomic effects of thyroid hormones on the immune system cells: New targets, old players. *Steroids, The Proceedings of the 7th International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones (RRSH 2011)* 77, 988–995. doi:10.1016/j.steroids.2012.02.018

- De Vivo, A., Mancuso, A., Giacobbe, A., Moleti, M., Maggio Savasta, L., De Dominici, R., Priolo, A.M., Vermiglio, F., 2010. Thyroid function in women found to have early pregnancy loss. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 20, 633–637. doi:10.1089/thy.2009.0323
- DeBarber, A.E., Geraci, T., Colasurdo, V.P., Hackenmueller, S.A., Scanlan, T.S., 2008. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to enable quantification of 3-iodothyronamine from serum. *J. Chromatogr. A* 1210, 55–59. doi:10.1016/j.chroma.2008.09.022
- Dentice, M., Bandyopadhyay, A., Gereben, B., Callebaut, I., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Nissim, S., Mornon, J.-P., Zavacki, A.M., Zeöld, A., Capelo, L.P., Curcio-Morelli, C., Ribeiro, R., Harney, J.W., Tabin, C.J., Bianco, A.C., 2005a. The Hedgehog-inducible ubiquitin ligase subunit WSB-1 modulates thyroid hormone activation and PTHrP secretion in the developing growth plate. *Nat. Cell Biol.* 7, 698–705. doi:10.1038/ncb1272
- Dentice, M., Bandyopadhyay, A., Gereben, B., Callebaut, I., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Nissim, S., Mornon, J.-P., Zavacki, A.M., Zeöld, A., Capelo, L.P., Curcio-Morelli, C., Ribeiro, R., Harney, J.W., Tabin, C.J., Bianco, A.C., 2005b. The Hedgehog-inducible ubiquitin ligase subunit WSB-1 modulates thyroid hormone activation and PTHrP secretion in the developing growth plate. *Nat. Cell Biol.* 7, 698–705. doi:10.1038/ncb1272
- Diav-Citrin, O., Ornoy, A., 2002. Teratogen update: antithyroid drugs-methimazole, carbimazole, and propylthiouracil. *Teratology* 65, 38–44. doi:10.1002/tera.1096
- DiRenzo, J., Shang, Y., Phelan, M., Sif, S., Myers, M., Kingston, R., Brown, M., 2000. BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7541–7549.
- Djouhri, L., Lawson, S.N., 2004. Abeta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 46, 131–145. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.07.015
- Dogrul, A., Ossipov, M.H., Porreca, F., 2009. Differential mediation of descending pain facilitation and inhibition by spinal 5HT-3 and 5HT-7 receptors. *Brain Res.* 1280, 52–59. doi:10.1016/j.brainres.2009.05.001
- Dohán, O., De la Vieja, A., Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., Ginter, C.S., Carrasco, N., 2003. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr. Rev.* 24, 48–77. doi:10.1210/er.2001-0029
- Doly, S., Fischer, J., Brisorgueil, M.-J., Vergé, D., Conrath, M., 2005. Pre- and postsynaptic localization of the 5-HT7 receptor in rat dorsal spinal cord: immunocytochemical evidence. *J. Comp. Neurol.* 490, 256–269. doi:10.1002/cne.20667
- Dong, J., Yin, H., Liu, W., Wang, P., Jiang, Y., Chen, J., 2005. Congenital iodine deficiency and hypothyroidism impair LTP and decrease C-fos and C-jun expression in rat hippocampus. *Neurotoxicology* 26, 417–426. doi:10.1016/j.neuro.2005.03.003
- Donkó, Á., Morand, S., Korzeniowska, A., Boudreau, H.E., Zana, M., Hunyady, L., Geiszt, M., Leto, T.L., 2014. Hypothyroidism-associated missense mutation impairs NADPH oxidase activity and intracellular trafficking of Duox2. *Free Radic. Biol. Med.* 73, 190–200. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.006
- Donkó, A., Péterfi, Z., Sum, A., Leto, T., Geiszt, M., 2005. Dual oxidases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 2301–2308. doi:10.1098/rstb.2005.1767
- Donkó, A., Ruisanchez, E., Orient, A., Enyedi, B., Kapui, R., Péterfi, Z., de Deken, X., Benyó, Z., Geiszt, M., 2010. Urothelial cells produce hydrogen peroxide through the activation of Duox1. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 2040–2048. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.027

- Drake, A.J., Walker, B.R., 2004. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *J. Endocrinol.* 180, 1–16.
- Drever, B.D., Anderson, W.G.L., Johnson, H., O'Callaghan, M., Seo, S., Choi, D.-Y., Riedel, G., Platt, B., 2007. Memantine acts as a cholinergic stimulant in the mouse hippocampus. *J. Alzheimers Dis. JAD* 12, 319–333.
- Du, J., Koltzenburg, M., Carlton, S.M., 2001. Glutamate-induced excitation and sensitization of nociceptors in rat glabrous skin. *Pain* 89, 187–198.
- Dubin, A.E., Patapoutian, A., 2010. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J. Clin. Invest.* 120, 3760–3772. doi:10.1172/JCI42843
- Dumas, P., Autissier, N., Loireau, A., Michel, R., 1982. [Effects of 3,5,3'-triiodothyroacetic acid (TRIAc) on protein metabolism of genetically obese or non-obese Zucker rats]. *Comptes Rendus Séances Société Biol. Ses Fil.* 176, 178–183.
- Dupuy, C., Ohayon, R., Valent, A., Noël-Hudson, M.S., Dème, D., Virion, A., 1999. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J. Biol. Chem.* 274, 37265–37269.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Ellrich, J., Ulucan, C., Schnell, C., 2000. Are “neutral cells” in the rostral ventro-medial medulla subtypes of on- and off-cells? *Neurosci. Res.* 38, 419–423.
- Elnakish, M.T., Ahmed, A.A.E., Mohler, P.J., Janssen, P.M.L., 2015. Role of Oxidative Stress in Thyroid Hormone-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy and Associated Cardiac Dysfunction: An Undisclosed Story. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015. doi:10.1155/2015/854265
- Eng, P.H., Cardona, G.R., Fang, S.L., Previti, M., Alex, S., Carrasco, N., Chin, W.W., Braverman, L.E., 1999. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 140, 3404–3410. doi:10.1210/endo.140.8.6893
- Eng, P.H., Cardona, G.R., Previti, M.C., Chin, W.W., Braverman, L.E., 2001. Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 144, 139–144.
- Entringer, S., Epel, E.S., Kumsta, R., Lin, J., Hellhammer, D.H., Blackburn, E.H., Wüst, S., Wadhwa, P.D., 2011. Stress exposure in intrauterine life is associated with shorter telomere length in young adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, E513–518. doi:10.1073/pnas.1107759108
- Entringer, S., Epel, E.S., Lin, J., Buss, C., Shahbaba, B., Blackburn, E.H., Simhan, H.N., Wadhwa, P.D., 2013. Maternal psychosocial stress during pregnancy is associated with newborn leukocyte telomere length. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 208, 134.e1–7. doi:10.1016/j.ajog.2012.11.033
- Everett, L.A., Belyantseva, I.A., Noben-Trauth, K., Cantos, R., Chen, A., Thakkar, S.I., Hoogstraten-Miller, S.L., Kachar, B., Wu, D.K., Green, E.D., 2001. Targeted disruption of mouse Pds provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 10, 153–161.
- Farwell, A.P., Dubord-Tomasetti, S.A., Pietrzykowski, A.Z., Stachelek, S.J., Leonard, J.L., 2005. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 154, 121–135. doi:10.1016/j.devbrainres.2004.07.016
- Farwell, A.P., Tranter, M.P., Leonard, J.L., 1995. Thyroxine-dependent regulation of integrin-laminin interactions in astrocytes. *Endocrinology* 136, 3909–3915. doi:10.1210/endo.136.9.7649099

- Feldman, J.D., Vazquez, J.J., Kurtz, S.M., 1961. Maturation of the rat fetal thyroid. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 11, 365–383.
- Fernández, V., Barrientos, X., Kipreos, K., Valenzuela, A., Videla, L.A., 1985. Superoxide radical generation, NADPH oxidase activity, and cytochrome P-450 content of rat liver microsomal fractions in an experimental hyperthyroid state: relation to lipid peroxidation. *Endocrinology* 117, 496–501. doi:10.1210/endo-117-2-496
- Ferreiro, B., Bernal, J., Goodyer, C.G., Branchard, C.L., 1988. Estimation of nuclear thyroid hormone receptor saturation in human fetal brain and lung during early gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67, 853–856. doi:10.1210/jcem-67-4-853
- Fields, H.L., 1992. Is there a facilitating component to central pain modulation? *J. Pain* 1, 71–78. doi:10.1016/1058-9139(92)90030-G
- Fields, H.L., Bry, J., Hentall, I., Zorman, G., 1983. The activity of neurons in the rostral medulla of the rat during withdrawal from noxious heat. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 3, 2545–2552.
- Fields, H.L., Heinricher, M.M., 1985. Anatomy and physiology of a nociceptive modulatory system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 308, 361–374.
- Fisher, D.A., Dussault, J.H., Sack, J., Chopra, I.J., 1976. Ontogenesis of hypothalamic--pituitary--thyroid function and metabolism in man, sheep, and rat. *Recent Prog. Horm. Res.* 33, 59–116.
- Fisher, D.A., Hoath, S., Lakshmanan, J., 1982. The thyroid hormone effects on growth and development may be mediated by growth factors. *Endocrinol. Exp.* 16, 259–271.
- Fisher, D.A., Klein, A.H., 1981. Thyroid development and disorders of thyroid function in the newborn. *N. Engl. J. Med.* 304, 702–712. doi:10.1056/NEJM198103193041205
- Fitzgerald, K.T., Bronstein, A.C., 2013. Selective serotonin reuptake inhibitor exposure. *Top. Companion Anim. Med.* 28, 13–17. doi:10.1053/j.tcam.2013.03.003
- Fitzgerald, M., Jennings, E., 1999. The postnatal development of spinal sensory processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7719–7722.
- Foulkes, T., Wood, J.N., 2008. Pain genes. *PLoS Genet.* 4, e1000086. doi:10.1371/journal.pgen.1000086
- Fowden, A.L., Forhead, A.J., 2004. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reprod. Camb. Engl.* 127, 515–526. doi:10.1530/rep.1.00033
- Fraichard, A., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J.P., Trouillas, J., Dehay, C., Legrand, C., Gauthier, K., Keding, M., Malaval, L., Rousset, B., Samarut, J., 1997. The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *EMBO J.* 16, 4412–4420. doi:10.1093/emboj/16.14.4412
- Frascarelli, S., Ghelardoni, S., Chiellini, G., Vargiu, R., Ronca-Testoni, S., Scanlan, T.S., Grandy, D.K., Zucchi, R., 2008. Cardiac effects of trace amines: pharmacological characterization of trace amine-associated receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 587, 231–236. doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.055
- Friesema, E.C., Docter, R., Moerings, E.P., Stieger, B., Hagenbuch, B., Meier, P.J., Krenning, E.P., Hennemann, G., Visser, T.J., 1999. Identification of thyroid hormone transporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 497–501. doi:10.1006/bbrc.1998.9974
- Friesema, E.C.H., Ganguly, S., Abdalla, A., Manning Fox, J.E., Halestrap, A.P., Visser, T.J., 2003. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J. Biol. Chem.* 278, 40128–40135. doi:10.1074/jbc.M300909200
- Friesema, E.C.H., Jansen, J., Jachtenberg, J.-W., Visser, W.E., Kester, M.H.A., Visser, T.J., 2008. Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 1357–1369. doi:10.1210/me.2007-0112

- Fu, C., Zheng, H., Zhang, S., Chen, Y., Su, J., Wang, J., Xie, B., Hu, X., Fan, X., Luo, J., Li, C., Chen, R., Shen, Y., Chen, S., 2016. Mutation screening of the SLC26A4 gene in a cohort of 192 Chinese patients with congenital hypothyroidism. *Arch. Endocrinol. Metab.* doi:10.1590/2359-3997000000108
- Fu, J., Refetoff, S., Dumitrescu, A.M., 2013. Inherited defects of thyroid hormone-cell-membrane transport: review of recent findings. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 20, 434–440. doi:10.1097/01.med.0000432531.03233.ad
- Fujiwara, K., Adachi, H., Nishio, T., Unno, M., Tokui, T., Okabe, M., Onogawa, T., Suzuki, T., Asano, N., Tanemoto, M., Seki, M., Shiiba, K., Suzuki, M., Kondo, Y., Nunoki, K., Shimosegawa, T., Iinuma, K., Ito, S., Matsuno, S., Abe, T., 2001. Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology* 142, 2005–2012. doi:10.1210/endo.142.5.8115
- Galli, E., Marchini, M., Saba, A., Berti, S., Tonacchera, M., Vitti, P., Scanlan, T.S., Iervasi, G., Zucchi, R., 2012. Detection of 3-iodothyronamine in human patients: a preliminary study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, E69–74. doi:10.1210/jc.2011-1115
- Galofré Ferrater, J.C., Corrales Hernández, J.J., Pérez Corral, B., Cantón Blanco, A., Alonso Pedrol, N., Pérez Pérez, A., Lajo Morales, T., Tortosa Henzi, F., 2009. [Clinical guideline for the diagnosis and treatment of subclinical thyroid dysfunction in pregnancy. Working Group on Subclinical Thyroid Dysfunction of the Spanish Endocrinology Society]. *Endocrinol. Nutr. Órgano Soc. Esp. Endocrinol. Nutr.* 56, 85–91. doi:10.1016/S1575-0922(09)70556-X
- Galton, V.A., Schneider, M.J., Clark, A.S., St Germain, D.L., 2009. Life without thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine conversion: studies in mice devoid of the 5'-deiodinases. *Endocrinology* 150, 2957–2963. doi:10.1210/en.2008-1572
- Galton, V.A., Wood, E.T., St Germain, E.A., Withrow, C.-A., Aldrich, G., St Germain, G.M., Clark, A.S., St Germain, D.L., 2007. Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development. *Endocrinology* 148, 3080–3088. doi:10.1210/en.2006-1727
- Garber, J.R., Cobin, R.H., Gharib, H., Hennessey, J.V., Klein, I., Mechanick, J.I., Pessah-Pollack, R., Singer, P.A., Woeber, K.A., American Association of Clinical Endocrinologists and American Thyroid Association Taskforce on Hypothyroidism in Adults, 2012. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. *Endocr. Pract. Off. J. Am. Coll. Endocrinol. Am. Assoc. Clin. Endocrinol.* 18, 988–1028. doi:10.4158/EP12280.GL
- Gärtner, R., 2009. Thyroid diseases in pregnancy. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 21, 501–507. doi:10.1097/GCO.0b013e328332a836
- Gebhart, G.F., 2004. Descending modulation of pain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 729–737. doi:10.1016/j.neubiorev.2003.11.008
- Geffner, D.L., Azukizawa, M., Hershman, J.M., 1975. Propylthiouracil blocks extrathyroidal conversion of thyroxine to triiodothyronine and augments thyrotropin secretion in man. *J. Clin. Invest.* 55, 224–229. doi:10.1172/JCI107925
- Genaro, G., Schmidek, W.R., 2002. The influence of handling and isolation postweaning on open field, exploratory and maternal behavior of female rats. *Physiol. Behav.* 75, 681–688.
- Gereben, B., Goncalves, C., Harney, J.W., Larsen, P.R., Bianco, A.C., 2000. Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: a novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 14, 1697–1708. doi:10.1210/mend.14.11.0558

- Gereben, B., Zavacki, A.M., Ribich, S., Kim, B.W., Huang, S.A., Simonides, W.S., Zeöld, A., Bianco, A.C., 2008. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr. Rev.* 29, 898–938. doi:10.1210/er.2008-0019
- Gharib, H., Tuttle, R.M., Baskin, H.J., Fish, L.H., Singer, P.A., McDermott, M.T., American Association of Clinical Endocrinologists, American Thyroid Association, Endocrine Society, 2005. Consensus Statement #1: Subclinical thyroid dysfunction: a joint statement on management from the American Association of Clinical Endocrinologists, the American Thyroid Association, and The Endocrine Society. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 15, 24–28–33. doi:10.1089/thy.2005.15.24
- Gilbert, M.E., Sui, L., Walker, M.J., Anderson, W., Thomas, S., Smoller, S.N., Schon, J.P., Phani, S., Goodman, J.H., 2007. Thyroid hormone insufficiency during brain development reduces parvalbumin immunoreactivity and inhibitory function in the hippocampus. *Endocrinology* 148, 92–102. doi:10.1210/en.2006-0164
- Gillam, M.P., Sidhaye, A.R., Lee, E.J., Rutishauser, J., Stephan, C.W., Kopp, P., 2004. Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. *J. Biol. Chem.* 279, 13004–13010. doi:10.1074/jbc.M313648200
- Glinoe, D., 1999. What happens to the normal thyroid during pregnancy? *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 9, 631–635. doi:10.1089/thy.1999.9.631
- Glinoe, D., 1998. The systematic screening and management of hypothyroidism and hyperthyroidism during pregnancy. *Trends Endocrinol. Metab.* 9, 403–411.
- Glinoe, D., 1997. The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. *Endocr. Rev.* 18, 404–433. doi:10.1210/edrv.18.3.0300
- Glinoe, D., 1993. Maternal thyroid function in pregnancy. *J. Endocrinol. Invest.* 16, 374–378. doi:10.1007/BF03348861
- Glinoe, D., De Nayer, P., Robyn, C., Lejeune, B., Kinthaert, J., Meuris, S., 1993. Serum levels of intact human chorionic gonadotropin (HCG) and its free alpha and beta subunits, in relation to maternal thyroid stimulation during normal pregnancy. *J. Endocrinol. Invest.* 16, 881–888.
- Gnidehou, S., Caillou, B., Talbot, M., Ohayon, R., Kaniewski, J., Noël-Hudson, M.-S., Morand, S., Agnangji, D., Sezan, A., Courtin, F., Virion, A., Dupuy, C., 2004. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 1574–1576. doi:10.1096/fj.04-2023fje
- Goodman, J.H., Gilbert, M.E., 2007. Modest thyroid hormone insufficiency during development induces a cellular malformation in the corpus callosum: a model of cortical dysplasia. *Endocrinology* 148, 2593–2597. doi:10.1210/en.2006-1276
- Goodman LS, Brunton LL, Blumenthal D, Buxton I, 2007. Goodman and Gilman's manual of pharmacology and therapeutics. McGraw-Hill.
- Grasberger, H., 2010. Defects of thyroidal hydrogen peroxide generation in congenital hypothyroidism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 322, 99–106. doi:10.1016/j.mce.2010.01.029
- Grasberger, H., De Deken, X., Miot, F., Pohlenz, J., Refetoff, S., 2007. Missense mutations of dual oxidase 2 (DUOX2) implicated in congenital hypothyroidism have impaired trafficking in cells reconstituted with DUOX2 maturation factor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 21, 1408–1421. doi:10.1210/me.2007-0018
- Grasberger, H., Refetoff, S., 2006. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent. *J. Biol. Chem.* 281, 18269–18272. doi:10.1074/jbc.C600095200
- Gredilla, R., López Torres, M., Portero-Otín, M., Pamplona, R., Barja, G., 2001. Influence of hyper- and hypothyroidism on lipid peroxidation, unsaturation of phospholipids,

- glutathione system and oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mice skeletal muscle. *Mol. Cell. Biochem.* 221, 41–48.
- Green, G.M., Scarth, J., Dickenson, A., 2000. An excitatory role for 5-HT in spinal inflammatory nociceptive transmission; state-dependent actions via dorsal horn 5-HT(3) receptors in the anaesthetized rat. *Pain* 89, 81–88.
- Grijota-Martínez, C., Díez, D., Morreale de Escobar, G., Bernal, J., Morte, B., 2011. Lack of action of exogenously administered T3 on the fetal rat brain despite expression of the monocarboxylate transporter 8. *Endocrinology* 152, 1713–1721. doi:10.1210/en.2010-1014
- Grisham, M.B., Johnson, G.G., Lancaster, J.R., 1996. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol.* 268, 237–246.
- Hackenmueller, S.A., Marchini, M., Saba, A., Zucchi, R., Scanlan, T.S., 2012. Biosynthesis of 3-iodothyronamine (T1AM) is dependent on the sodium-iodide symporter and thyroperoxidase but does not involve extrathyroidal metabolism of T4. *Endocrinology* 153, 5659–5667. doi:10.1210/en.2012-1254
- Haddow, J.E., Palomaki, G.E., Allan, W.C., Williams, J.R., Knight, G.J., Gagnon, J., O’Heir, C.E., Mitchell, M.L., Hermos, R.J., Waisbren, S.E., Faix, J.D., Klein, R.Z., 1999. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N. Engl. J. Med.* 341, 549–555. doi:10.1056/NEJM199908193410801
- Hagenbuch, B., 2007. Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 21, 209–221. doi:10.1016/j.beem.2007.03.004
- Hagenbuch, B., Stieger, B., Foguet, M., Lübbert, H., Meier, P.J., 1991. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10629–10633.
- Halestrap, A.P., Meredith, D., 2004. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 619–628. doi:10.1007/s00424-003-1067-2
- Hall, E.D., Yonkers, P.A., Andrus, P.K., Cox, J.W., Anderson, D.K., 1992. Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidants in acute brain and spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 9 Suppl 2, S425–442.
- Hamann, K., Durkes, A., Ouyang, H., Uchida, K., Pond, A., Shi, R., 2008. Critical role of acrolein in secondary injury following ex vivo spinal cord trauma. *J. Neurochem.* 107, 712–721. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05622.x
- Hapon, M.B., Simoncini, M., Via, G., Jahn, G.A., 2003. Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. *Reprod. Camb. Engl.* 126, 371–382.
- Hasegawa, M., Wada, H., 2013. Developmental hypothyroidism disrupts visual signal detection performance in rats. *Physiol. Behav.* 112–113, 90–95. doi:10.1016/j.physbeh.2013.02.019
- Heinricher, M.M., Barbaro, N.M., Fields, H.L., 1989. Putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla of the rat: firing of on- and off-cells is related to nociceptive responsiveness. *Somatosens. Mot. Res.* 6, 427–439.
- Hennemann, G., Docter, R., Friesema, E.C., de Jong, M., Krenning, E.P., Visser, T.J., 2001. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr. Rev.* 22, 451–476. doi:10.1210/edrv.22.4.0435
- Herzmann, C., Torrens, J.K., 1999. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N. Engl. J. Med.* 341, 2015; author reply 2017. doi:10.1056/NEJM199912233412613

- Heuer, H., Maier, M.K., Iden, S., Mittag, J., Friesema, E.C.H., Visser, T.J., Bauer, K., 2005. The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology* 146, 1701–1706. doi:10.1210/en.2004-1179
- Heuer, H., Visser, T.J., 2013. The pathophysiological consequences of thyroid hormone transporter deficiencies: Insights from mouse models. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3974–3978. doi:10.1016/j.bbagen.2012.04.009
- Hingorani, M., Spitzweg, C., Vassaux, G., Newbold, K., Melcher, A., Pandha, H., Vile, R., Harrington, K., 2010. The biology of the sodium iodide symporter and its potential for targeted gene delivery. *Curr. Cancer Drug Targets* 10, 242–267.
- Hiroi, Y., Kim, H.-H., Ying, H., Furuya, F., Huang, Z., Simoncini, T., Noma, K., Ueki, K., Nguyen, N.-H., Scanlan, T.S., Moskowitz, M.A., Cheng, S.-Y., Liao, J.K., 2006. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 14104–14109. doi:10.1073/pnas.0601600103
- Hoefig, C.S., Köhrle, J., Brabant, G., Dixit, K., Yap, B., Strasburger, C.J., Wu, Z., 2011. Evidence for extrathyroidal formation of 3-iodothyronamine in humans as provided by a novel monoclonal antibody-based chemiluminescent serum immunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 1864–1872. doi:10.1210/jc.2010-2680
- Hoefig, C.S., Renko, K., Piehl, S., Scanlan, T.S., Bertoldi, M., Opladen, T., Hoffmann, G.F., Klein, J., Blankenstein, O., Schweizer, U., Köhrle, J., 2012. Does the aromatic L-amino acid decarboxylase contribute to thyronamine biosynthesis? *Mol. Cell. Endocrinol.* 349, 195–201. doi:10.1016/j.mce.2011.10.024
- Horacek, J., Spitalnikova, S., Dlabalova, B., Malirova, E., Vizda, J., Sviliyas, I., Cepkova, J., McGrath, C., Maly, J., 2010. Universal screening detects two-times more thyroid disorders in early pregnancy than targeted high-risk case finding. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 163, 645–650. doi:10.1530/EJE-10-0516
- Horn, S., Kersseboom, S., Mayerl, S., Müller, J., Groba, C., Trajkovic-Arsic, M., Ackermann, T., Visser, T.J., Heuer, H., 2013. Tetrac can replace thyroid hormone during brain development in mouse mutants deficient in the thyroid hormone transporter mct8. *Endocrinology* 154, 968–979. doi:10.1210/en.2012-1628
- Huang, C.-J., Lei, T.-H., Chang, W.-L., Tu, T.-Y., Shiao, A.-S., Chiu, C.-Y., Jap, T.-S., 2013. A Novel mutation in the SLC26A4 gene in a Chinese family with Pendred syndrome. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 77, 1495–1499. doi:10.1016/j.ijporl.2013.06.017
- Huber, R.D., Gao, B., Sidler Pfändler, M.-A., Zhang-Fu, W., Leuthold, S., Hagenbuch, B., Folkers, G., Meier, P.J., Stieger, B., 2007. Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C795-806. doi:10.1152/ajpcell.00597.2005
- Hulur, I., Hermanns, P., Nestoris, C., Heger, S., Refetoff, S., Pohlenz, J., Grasberger, H., 2011. A single copy of the recently identified dual oxidase maturation factor (DUOXA) 1 gene produces only mild transient hypothyroidism in a patient with a novel biallelic DUOXA2 mutation and monoallelic DUOXA1 deletion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E841-845. doi:10.1210/jc.2010-2321
- Hume, R., Simpson, J., Delahunty, C., van Toor, H., Wu, S.Y., Williams, F.L.R., Visser, T.J., Scottish Preterm Thyroid Group, 2004. Human fetal and cord serum thyroid hormones: developmental trends and interrelationships. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 4097–4103. doi:10.1210/jc.2004-0573
- Hussain, S.A.-R., Al-Khalifa, I.I., Jasim, N.A., Gorial, F.I., 2011. Adjuvant use of melatonin for treatment of fibromyalgia. *J. Pineal Res.* 50, 267–271. doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00836.x

- Hylden, J.L., Anton, F., Nahin, R.L., 1989a. Spinal lamina I projection neurons in the rat: collateral innervation of parabrachial area and thalamus. *Neuroscience* 28, 27–37.
- Hylden, J.L., Nahin, R.L., Traub, R.J., Dubner, R., 1989b. Expansion of receptive fields of spinal lamina I projection neurons in rats with unilateral adjuvant-induced inflammation: the contribution of dorsal horn mechanisms. *Pain* 37, 229–243.
- Ianculescu, A.G., Friesema, E.C.H., Visser, T.J., Giacomini, K.M., Scanlan, T.S., 2010. Transport of thyroid hormones is selectively inhibited by 3-iodothyronamine. *Mol. Biosyst.* 6, 1403–1410. doi:10.1039/b926588k
- İnanır, A., Sogut, E., 2013. Evaluation of Pain Intensity and Oxidative Stress Levels in Patients with Inflammatory and non-Inflammatory Back Pain. *Eur. J. Gen. Med.* 10.
- Ishido, Y., Luo, Y., Yoshihara, A., Hayashi, M., Yoshida, A., Hisatome, I., Suzuki, K., 2015. Follicular thyroglobulin enhances gene expression necessary for thyroid hormone secretion. *Endocr. J.* 62, 1007–1015. doi:10.1507/endocrj.EJ15-0263
- Ito, K., Uchida, Y., Ohtsuki, S., Aizawa, S., Kawakami, H., Katsukura, Y., Kamiie, J., Terasaki, T., 2011. Quantitative membrane protein expression at the blood-brain barrier of adult and younger cynomolgus monkeys. *J. Pharm. Sci.* 100, 3939–3950. doi:10.1002/jps.22487
- Jamison, R.N., Mao, J., 2015. Opioid Analgesics. *Mayo Clin. Proc.* 90, 957–968. doi:10.1016/j.mayocp.2015.04.010
- Jarcho, J.M., Mayer, E.A., Jiang, Z.K., Feier, N.A., London, E.D., 2012. Pain, affective symptoms, and cognitive deficits in patients with cerebral dopamine dysfunction. *Pain* 153, 744–754. doi:10.1016/j.pain.2012.01.002
- Jiang, C., Xu, L., Chen, L., Han, Y., Tang, J., Yang, Y., Zhang, G., Liu, W., 2015. Selective suppression of microglial activation by paeoniflorin attenuates morphine tolerance. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 19, 908–919. doi:10.1002/ejp.617
- Jin, H., Teng, Y., Zhang, X., Yang, C., Xu, M., Yang, L., 2014. Noradrenergic mechanism involved in the nociceptive modulation of hippocampal CA3 region of normal rats. *Neurosci. Lett.* 574, 31–35. doi:10.1016/j.neulet.2014.05.012
- Jiskra, J., Bartáková, J., Holinka, Š., Límanová, Z., Springer, D., Antošová, M., Telička, Z., Potluková, E., 2011. Low prevalence of clinically high-risk women and pathological thyroid ultrasound among pregnant women positive in universal screening for thyroid disorders. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* 119, 530–535. doi:10.1055/s-0031-1284369
- Jo, S., Kalló, I., Bardóczi, Z., Arrojo e Drigo, R., Zeöld, A., Liposits, Z., Oliva, A., Lemmon, V.P., Bixby, J.L., Gereben, B., Bianco, A.C., 2012. Neuronal hypoxia induces Hsp40-mediated nuclear import of type 3 deiodinase as an adaptive mechanism to reduce cellular metabolism. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 8491–8500. doi:10.1523/JNEUROSCI.6514-11.2012
- Jonas, W., Lietzow, J., Wohlgemuth, F., Hoefig, C.S., Wiedmer, P., Schweizer, U., Köhrle, J., Schürmann, A., 2015. 3,5-Diiodo-L-thyronine (3,5-t₂) exerts thyromimetic effects on hypothalamus-pituitary-thyroid axis, body composition, and energy metabolism in male diet-induced obese mice. *Endocrinology* 156, 389–399. doi:10.1210/en.2014-1604
- Jones, S.L., Gebhart, G.F., 1986a. Quantitative characterization of ceruleospinal inhibition of nociceptive transmission in the rat. *J. Neurophysiol.* 56, 1397–1410.
- Jones, S.L., Gebhart, G.F., 1986b. Characterization of coeruleospinal inhibition of the nociceptive tail-flick reflex in the rat: mediation by spinal alpha 2-adrenoceptors. *Brain Res.* 364, 315–330.
- Joseph M.H., Marsden C.A., 1986. In HPLC of small molecules: a practical approach. C.K. Lim, Oxford.

- Jubbin J Jacob, Kewal Aditya, Shweta Achint, Tapasya Dhar, Kumkum Avasti, 2012. Increased Pregnancy Losses and Poor Neonatal Outcomes in Women with First-Trimester TSH Levels between 2.5 and 4 mIU/L Compared to Euthyroid Women with TSH Less Than or Equal to 2.5, in: *Female Reproduction: The Endometrium & Pregnancy (Translational)*, Meeting Abstracts. The Endocrine Society, p. OR04-1-OR04-1.
- Kanaka-Gantenbein, C., 2010. Fetal origins of adult diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1205, 99–105. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05683.x
- Kanner, J., German, J.B., Kinsella, J.E., 1987. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 25, 317–364. doi:10.1080/10408398709527457
- Kasatkina, E.P., Samsonova, L.N., Ivakhnenko, V.N., Ibragimova, G.V., Ryabykh, A.V., Naumenko, L.L., Evdokimova, Y.A., 2006. Gestational hypothyroxinemia and cognitive function in offspring. *Neurosci. Behav. Physiol.* 36, 619–624. doi:10.1007/s11055-006-0066-0
- Kavirajan, H., 2009. Memantine: a comprehensive review of safety and efficacy. *Expert Opin. Drug Saf.* 8, 89–109. doi:10.1517/14740330802528420
- Kayser, V., Guilbaud, G., 1987. Local and remote modifications of nociceptive sensitivity during carrageenin-induced inflammation in the rat. *Pain* 28, 99–107.
- Kayser, V., Viguier, F., Melfort, M., Bourgoin, S., Hamon, M., Masson, J., 2015. Altered nociception in mice with genetically induced hypoglutamatergic tone. *Neuroscience* 293, 80–91. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.02.044
- Kesim, M., Yanik, M.N., Kadioglu, M., Pepeoglu, D., Erkoseoglu, I., Kalyoncu, N.I., Yaris, E., 2014. The evaluation of analgesic effects of milnacipran and sertraline in tail-flick test. *Bratisl. Lekárske Listy* 115, 3–6.
- Kester, M.H.A., Martinez de Mena, R., Obregon, M.J., Marinkovic, D., Howatson, A., Visser, T.J., Hume, R., Morreale de Escobar, G., 2004. Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 3117–3128. doi:10.1210/jc.2003-031832
- Kim, D.H., Fields, H.L., Barbaro, N.M., 1990. Morphine analgesia and acute physical dependence: rapid onset of two opposing, dose-related processes. *Brain Res.* 516, 37–40.
- Kinne, A., Schüle, R., Krause, G., 2011. Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid Res.* 4, S7. doi:10.1186/1756-6614-4-S1-S7
- Kinne, A., Wittner, M., Wirth, E.K., Hinz, K.M., Schüle, R., Köhrle, J., Krause, G., 2015. Involvement of the L-Type Amino Acid Transporter Lat2 in the Transport of 3,3'-Diiodothyronine across the Plasma Membrane. *Eur. Thyroid J.* 4, 42–50. doi:10.1159/000381542
- Kitaichi, Y., Inoue, T., Nakagawa, S., Boku, S., Kakuta, A., Izumi, T., Koyama, T., 2010. Sertraline increases extracellular levels not only of serotonin, but also of dopamine in the nucleus accumbens and striatum of rats. *Eur. J. Pharmacol.* 647, 90–96. doi:10.1016/j.ejphar.2010.08.026
- Klieverik, L.P., Foppen, E., Ackermans, M.T., Serlie, M.J., Sauerwein, H.P., Scanlan, T.S., Grandy, D.K., Fliers, E., Kalsbeek, A., 2009. Central effects of thyronamines on glucose metabolism in rats. *J. Endocrinol.* 201, 377–386. doi:10.1677/JOE-09-0043
- Klop, E.M., Mouton, L.J., Hulsebosch, R., Boers, J., Holstege, G., 2005. In cat four times as many lamina I neurons project to the parabrachial nuclei and twice as many to the periaqueductal gray as to the thalamus. *Neuroscience* 134, 189–197. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.03.035
- Klubo-Gwieddzinska, J., Burman, K.D., Van Nostrand, D., Wartofsky, L., 2011. Levothyroxine treatment in pregnancy: indications, efficacy, and therapeutic regimen. *J. Thyroid Res.* 2011, 843591. doi:10.4061/2011/843591

- Kobayashi, K., Kubota, H., Hojo, R., Miyagawa, M., 2014. Dose-dependent effects of perinatal hypothyroidism on postnatal testicular development in rat offspring. *J. Toxicol. Sci.* 39, 867–874.
- Koenig, R.J., Lazar, M.A., Hodin, R.A., Brent, G.A., Larsen, P.R., Chin, W.W., Moore, D.D., 1989. Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature* 337, 659–661. doi:10.1038/337659a0
- Kogai, T., Liu, Y.-Y., Richter, L.L., Mody, K., Kagechika, H., Brent, G.A., 2010. Retinoic acid induces expression of the thyroid hormone transporter, monocarboxylate transporter 8 (Mct8). *J. Biol. Chem.* 285, 27279–27288. doi:10.1074/jbc.M110.123158
- Köhrle, J., 1999. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151, 103–119.
- Koibuchi, N., Chin, W.W., 2000. Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 11, 123–128.
- Kolberg, C., Horst, A., Moraes, M.S., Duarte, F.C.K., Riffel, A.P.K., Scheid, T., Kolberg, A., Partata, W.A., 2015. Peripheral oxidative stress blood markers in patients with chronic back or neck pain treated with high-velocity, low-amplitude manipulation. *J. Manipulative Physiol. Ther.* 38, 119–129. doi:10.1016/j.jmpt.2014.11.003
- KONG, L., WEI, Q., FEDAIL, J.S., SHI, F., NAGAOKA, K., WATANABE, G., 2015. Effects of thyroid hormones on the antioxidative status in the uterus of young adult rats. *J. Reprod. Dev.* 61, 219–227. doi:10.1262/jrd.2014-129
- Korevaar, T.I.M., Schalekamp-Timmermans, S., de Rijke, Y.B., Visser, W.E., Visser, W., de Muinck Keizer-Schrama, S.M.P.F., Hofman, A., Ross, H.A., Hooijkaas, H., Tiemeier, H., Bongers-Schokking, J.J., Jaddoe, V.W.V., Visser, T.J., Steegers, E.A.P., Medici, M., Peeters, R.P., 2013. Hypothyroxinemia and TPO-antibody positivity are risk factors for premature delivery: the generation R study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 4382–4390. doi:10.1210/jc.2013-2855
- Koromilas, C., Liapi, C., Zarros, A., Stolakis, V., Tsagianni, A., Skandali, N., Al-Humadi, H., Tsakiris, S., 2014. Effects of experimentally-induced maternal hypothyroidism on crucial offspring rat brain enzyme activities. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 35, 1–6. doi:10.1016/j.ijdevneu.2014.03.002
- Koromilas, C., Liapi, C., Zarros, A., Tsela, S., Zissis, K.M., Kalafatakis, K., Skandali, N., Voumvourakis, K., Carageorgiou, H., Tsakiris, S., 2015a. Inhibition of Na(+),K(+) -ATPase in the hypothalamus, pons and cerebellum of the offspring rat due to experimentally-induced maternal hypothyroidism. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med. Off. J. Eur. Assoc. Perinat. Med. Fed. Asia Ocean. Perinat. Soc. Int. Soc. Perinat. Obstet.* 28, 1438–1444. doi:10.3109/14767058.2014.955003
- Koromilas, C., Tsakiris, S., Kalafatakis, K., Zarros, A., Stolakis, V., Kimpizi, D., Bimpis, A., Tsagianni, A., Liapi, C., 2015b. Experimentally-induced maternal hypothyroidism alters crucial enzyme activities in the frontal cortex and hippocampus of the offspring rat. *Metab. Brain Dis.* 30, 241–246. doi:10.1007/s11011-014-9581-9
- Kratzsch, J., Pulzer, F., 2008. Thyroid gland development and defects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 22, 57–75. doi:10.1016/j.beem.2007.08.006
- Krause, K.-H., 2004. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57, S28-29.
- Kriplani, A., Buckshee, K., Bhargava, V.L., Takkar, D., Ammini, A.C., 1994. Maternal and perinatal outcome in thyrotoxicosis complicating pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 54, 159–163.
- Kumar, A., Agarwal, K., Gupta, R.K., Kar, P., 2009. Obstetric outcome in women with hepatitis C virus infection and thyroid dysfunction. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 88, 1133–1137. doi:10.1080/00016340903144220

- Kumari S.N, Damodara Gowda, K.M., Damodra Gowda S., 2011. Oxidative Stress in Hypo and Hyperthyroidism. *AJMS* 4, 49–53.
- Kumru, P., Erdogan, E., Arisoy, R., Demirci, O., Ozkoral, A., Ardic, C., Ertekin, A.A., Erdogan, S., Ozdemir, N.N., 2015. Effect of thyroid dysfunction and autoimmunity on pregnancy outcomes in low risk population. *Arch. Gynecol. Obstet.* 291, 1047–1054. doi:10.1007/s00404-014-3533-9
- Kunitake, J.M., Hartman, N., Henson, L.C., Lieberman, J., Williams, D.E., Wong, M., Hershman, J.M., 1989. 3,5,3'-triiodothyroacetic acid therapy for thyroid hormone resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69, 461–466. doi:10.1210/jcem-69-2-461
- Lambeth, J.D., 2004. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189. doi:10.1038/nri1312
- Larsen, P.R., Silva, J.E., Kaplan, M.M., 1981. Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications. *Endocr. Rev.* 2, 87–102. doi:10.1210/edrv-2-1-87
- Lasley, S.M., Gilbert, M.E., 2011. Developmental thyroid hormone insufficiency reduces expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in adults but not in neonates. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 464–472. doi:10.1016/j.ntt.2011.04.001
- Lazarus, J., Brown, R.S., Daumerie, C., Hubalewska-Dydejczyk, A., Negro, R., Vaidya, B., 2014. 2014 European thyroid association guidelines for the management of subclinical hypothyroidism in pregnancy and in children. *Eur. Thyroid J.* 3, 76–94. doi:10.1159/000362597
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 53, 597–652.
- Leal, C.A.M., Schetinger, M.R.C., Leal, D.B.R., Morsch, V.M., da Silva, A.S., Rezer, J.F.P., de Baires, A.V., Jaques, J.A.D.S., 2011. Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women. *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.* 16, 230–236. doi:10.1179/1351000211Y.0000000013
- Lee, P.R., Brady, D., Koenig, J.I., 2003. Thyroid hormone regulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit mRNA expression in adult brain. *J. Neuroendocrinol.* 15, 87–92.
- Lehmphul, I., Brabant, G., Wallaschofski, H., Ruchala, M., Strasburger, C.J., Köhrle, J., Wu, Z., 2014. Detection of 3,5-diiodothyronine in sera of patients with altered thyroid status using a new monoclonal antibody-based chemiluminescence immunoassay. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 24, 1350–1360. doi:10.1089/thy.2013.0688
- Lemkine, G.F., Raj, A., Alfama, G., Turque, N., Hassani, Z., Alegria-Prévot, O., Samarut, J., Levi, G., Demeneix, B.A., 2005. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 863–865. doi:10.1096/fj.04-2916fje
- Lewin, G.R., Moshourab, R., 2004. Mechanosensation and pain. *J. Neurobiol.* 61, 30–44. doi:10.1002/neu.20078
- Lewit-Bentley, A., Réty, S., 2000. EF-hand calcium-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 637–643.
- Li, C., Sugam, J.A., Lowery-Gionta, E.G., McElligott, Z.A., McCall, N.M., Lopez, A.J., McKlveen, J.M., Pleil, K.E., Kash, T.L., 2016. Mu Opioid Receptor Modulation of Dopamine Neurons in the Periaqueductal Gray/Dorsal Raphe: A Role in Regulation of Pain. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* doi:10.1038/npp.2016.12
- Li, M., Iismaa, S.E., Naqvi, N., Nicks, A., Husain, A., Graham, R.M., 2014. Thyroid hormone action in postnatal heart development. *Stem Cell Res.* 13, 582–591. doi:10.1016/j.scr.2014.07.001

- Li, Y., Shan, Z., Teng, W., Yu, X., Li, Y., Fan, C., Teng, X., Guo, R., Wang, H., Li, J., Chen, Y., Wang, W., Chawinga, M., Zhang, L., Yang, L., Zhao, Y., Hua, T., 2010. Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25-30 months. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 72, 825–829. doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03743.x
- Lin, H.-Y., Sun, M., Tang, H.-Y., Lin, C., Luidens, M.K., Mousa, S.A., Incerpi, S., Drusano, G.L., Davis, F.B., Davis, P.J., 2009. L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C980-991. doi:10.1152/ajpcell.00305.2008
- Lin, H.-Y., Tang, H.-Y., Shih, A., Keating, T., Cao, G., Davis, P.J., Davis, F.B., 2007. Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic. *Steroids* 72, 180–187. doi:10.1016/j.steroids.2006.11.014
- Lin, K.H., Fukuda, T., Cheng, S.Y., 1990. Hormone and DNA binding activity of a purified human thyroid hormone nuclear receptor expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265, 5161–5165.
- Liu, C.H., D'Arceuil, H.E., de Crespigny, A.J., 2004. Direct CSF injection of MnCl₂ for dynamic manganese-enhanced MRI. *Magn. Reson. Med.* 51, 978–987. doi:10.1002/mrm.20047
- Liu, H., Shan, Z., Li, C., Mao, J., Xie, X., Wang, W., Fan, C., Wang, H., Zhang, H., Han, C., Wang, X., Liu, X., Fan, Y., Bao, S., Teng, W., 2014. Maternal subclinical hypothyroidism, thyroid autoimmunity, and the risk of miscarriage: a prospective cohort study. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 24, 1642–1649. doi:10.1089/thy.2014.0029
- Loubière, L.S., Vasilopoulou, E., Bulmer, J.N., Taylor, P.M., Stieger, B., Verrey, F., McCabe, C.J., Franklyn, J.A., Kilby, M.D., Chan, S.-Y., 2010. Expression of thyroid hormone transporters in the human placenta and changes associated with intrauterine growth restriction. *Placenta* 31, 295–304. doi:10.1016/j.placenta.2010.01.013
- Maciel, L.M.Z., Magalhães, P.K.R., 2008. [Thyroid and pregnancy]. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 52, 1084–1095.
- Maia, A.L., Goemann, I.M., Meyer, E.L.S., Wajner, S.M., 2011a. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *J. Endocrinol.* 209, 283–297. doi:10.1530/JOE-10-0481
- Maia, A.L., Goemann, I.M., Meyer, E.L.S., Wajner, S.M., 2011b. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *J. Endocrinol.* 209, 283–297. doi:10.1530/JOE-10-0481
- Maia, A.L., Kim, B.W., Huang, S.A., Harney, J.W., Larsen, P.R., 2005a. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T₃ in euthyroid humans. *J. Clin. Invest.* 115, 2524–2533. doi:10.1172/JCI25083
- Maia, A.L., Kim, B.W., Huang, S.A., Harney, J.W., Larsen, P.R., 2005b. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T₃ in euthyroid humans. *J. Clin. Invest.* 115, 2524–2533. doi:10.1172/JCI25083
- Mancini, A., Di Segni, C., Raimondo, S., Olivieri, G., Silvestrini, A., Meucci, E., Currò, Diego, Mancini, A., Di Segni, C., Raimondo, S., Olivieri, G., Silvestrini, A., Meucci, E., Currò, Diego, 2016. Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation, Thyroid Hormones, Oxidative Stress, and Inflammation. *Mediat. Inflamm. Mediat. Inflamm.* 2016, 2016, e6757154. doi:10.1155/2016/6757154, 10.1155/2016/6757154
- Manni, M.E., De Siena, G., Saba, A., Marchini, M., Landucci, E., Gerace, E., Zazzeri, M., Musilli, C., Pellegrini-Giampietro, D., Matucci, R., Zucchi, R., Raimondi, L., 2013. Pharmacological effects of 3-iodothyronamine (T1AM) in mice include facilitation of memory acquisition and retention and reduction of pain threshold. *Br. J. Pharmacol.* 168, 354–362. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02137.x

- Männistö, T., Vääräsmäki, M., Pouta, A., Hartikainen, A.-L., Ruokonen, A., Surcel, H.-M., Bloigu, A., Järvelin, M.-R., Suvanto-Luukkonen, E., 2009. Perinatal outcome of children born to mothers with thyroid dysfunction or antibodies: a prospective population-based cohort study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 772–779. doi:10.1210/jc.2008-1520
- Maraka S, O’Keeffe DT, Montori VM, 2015. Subclinical hypothyroidism during pregnancy—should you expect this when you are expecting?: A teachable moment. *JAMA Intern. Med.* 175, 1088–1089. doi:10.1001/jamainternmed.2015.1348
- Marinò, M., McCluskey, R.T., 2000. Megalin-mediated transcytosis of thyroglobulin by thyroid cells is a calmodulin-dependent process. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 10, 461–469.
- Marinò, M., Zheng, G., Chiovato, L., Pinchera, A., Brown, D., Andrews, D., McCluskey, R.T., 2000. Role of megalin (gp330) in transcytosis of thyroglobulin by thyroid cells. A novel function in the control of thyroid hormone release. *J. Biol. Chem.* 275, 7125–7137.
- Martinez, R., Gomes, F.C.A., 2002. Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 49311–49318. doi:10.1074/jbc.M209284200
- Martínez-Galán, J.R., Pedraza, P., Santacana, M., Escobar del Ray, F., Morreale de Escobar, G., Ruiz-Marcos, A., 1997. Early effects of iodine deficiency on radial glial cells of the hippocampus of the rat fetus. A model of neurological cretinism. *J. Clin. Invest.* 99, 2701–2709. doi:10.1172/JCI119459
- Massart, C., Hoste, C., Virion, A., Ruf, J., Dumont, J.E., Van Sande, J., 2011. Cell biology of H₂O₂ generation in the thyroid: investigation of the control of dual oxidases (DUOX) activity in intact ex vivo thyroid tissue and cell lines. *Mol. Cell. Endocrinol.* 343, 32–44. doi:10.1016/j.mce.2011.05.047
- Max, M.B., Byas-Smith, M.G., Gracely, R.H., Bennett, G.J., 1995. Intravenous infusion of the NMDA antagonist, ketamine, in chronic posttraumatic pain with allodynia: a double-blind comparison to alfentanil and placebo. *Clin. Neuropharmacol.* 18, 360–368.
- Mayerl, S., Müller, J., Bauer, R., Richert, S., Kassmann, C.M., Darras, V.M., Buder, K., Boelen, A., Visser, T.J., Heuer, H., 2014. Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis. *J. Clin. Invest.* 124, 1987–1999. doi:10.1172/JCI70324
- Mayerl, S., Visser, T.J., Darras, V.M., Horn, S., Heuer, H., 2012. Impact of Oatp1c1 deficiency on thyroid hormone metabolism and action in the mouse brain. *Endocrinology* 153, 1528–1537. doi:10.1210/en.2011-1633
- McMillen, I.C., Robinson, J.S., 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol. Rev.* 85, 571–633. doi:10.1152/physrev.00053.2003
- Melzack, R., Wall, P.D., 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150, 971–979.
- Messarrah, M., Boumendjel, A., Chouabia, A., Klibet, F., Abdennour, C., Boulakoud, M.S., Feki, A.E., 2010. Influence of thyroid dysfunction on liver lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Für Toxikol. Pathol.* 62, 301–310. doi:10.1016/j.etp.2009.04.009
- Messarrah, M., Saoudi, M., Boumendjel, A., Boulakoud, M.S., Feki, A.E., 2011. Oxidative stress induced by thyroid dysfunction in rat erythrocytes and heart. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31, 33–41. doi:10.1016/j.etap.2010.09.003
- Mihai, R., 2011. Physiology of the pituitary, thyroid and adrenal glands. *Surg. - Oxf. Int. Ed.* 29, 419–427. doi:10.1016/j.mpsur.2011.06.017
- Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355–474.
- Millan, M.J., 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57, 1–164.

- Mintziari, G., Goulis, D.G., 2015. European Thyroid Association guidelines in comparison with the American Thyroid Association and Endocrine Society practice guidelines for the screening and treatment of hypothyroidism during pregnancy. *Horm. Athens Greece* 14, 174–175. doi:10.14310/horm.2002.1554
- Moeller, L.C., Broecker-Preuss, M., 2011. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res.* 4 Suppl 1, S6. doi:10.1186/1756-6614-4-S1-S6
- Mogil, J.S., Grisel, J.E., 1998. Transgenic studies of pain. *Pain* 77, 107–128.
- Mohan, V., Sinha, R.A., Pathak, A., Rastogi, L., Kumar, P., Pal, A., Godbole, M.M., 2012. Maternal thyroid hormone deficiency affects the fetal neocortico-genesis by reducing the proliferating pool, rate of neurogenesis and indirect neurogenesis. *Exp. Neurol.* 237, 477–488. doi:10.1016/j.expneurol.2012.07.019
- Molinoff, P.B., Axelrod, J., 1971. Biochemistry of catecholamines. *Annu. Rev. Biochem.* 40, 465–500. doi:10.1146/annurev.bi.40.070171.002341
- Morand, S., Dos Santos, O.F., Ohayon, R., Kaniewski, J., Noel-Hudson, M.-S., Virion, A., Dupuy, C., 2003. Identification of a truncated dual oxidase 2 (DUOX2) messenger ribonucleic acid (mRNA) in two rat thyroid cell lines. Insulin and forskolin regulation of DUOX2 mRNA levels in FRTL-5 cells and porcine thyrocytes. *Endocrinology* 144, 567–574. doi:10.1210/en.2002-220824
- Morel, V., Etienne, M., Wattiez, A.-S., Dupuis, A., Privat, A.-M., Chalus, M., Eschali r, A., Daulhac, L., Pickering, G., 2013. Memantine, a promising drug for the prevention of neuropathic pain in rat. *Eur. J. Pharmacol.* 721, 382–390. doi:10.1016/j.ejphar.2013.06.020
- Morel, V., Joly, D., Villatte, C., Dubray, C., Durando, X., Daulhac, L., Coudert, C., Roux, D., Pereira, B., Pickering, G., 2016. Memantine before Mastectomy Prevents Post-Surgery Pain: A Randomized, Blinded Clinical Trial in Surgical Patients. *PloS One* 11, e0152741. doi:10.1371/journal.pone.0152741
- Moreno, J.C., Bikker, H., Kempers, M.J.E., van Trotsenburg, A.S.P., Baas, F., de Vijlder, J.J.M., Vulsma, T., Ris-Stalpers, C., 2002. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. *N. Engl. J. Med.* 347, 95–102. doi:10.1056/NEJMoa012752
- Moriyama, K., Yamamoto, H., Futawaka, K., Atake, A., Kasahara, M., Tagami, T., 2016. Molecular characterization of human thyroid hormone receptor β isoform 4. *Endocr. Res.* 41, 34–42. doi:10.3109/07435800.2015.1066801
- Morreale de Escobar, G., Obregon, M.J., Escobar del Rey, F., 2004. Role of thyroid hormone during early brain development. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 151 Suppl 3, U25-37.
- Morreale de Escobar, G., Obreg n, M.J., Escobar del Rey, F., 2000. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3975–3987. doi:10.1210/jcem.85.11.6961
- Murakami, Y., Kohyama, N., Kobayashi, Y., Ohbayashi, M., Ohtani, H., Sawada, Y., Yamamoto, T., 2005. Functional characterization of human monocarboxylate transporter 6 (SLC16A5). *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 33, 1845–1851. doi:10.1124/dmd.105.005264
- Muzzio, A.M., Noyes, P.D., Stapleton, H.M., Lema, S.C., 2014. Tissue distribution and thyroid hormone effects on mRNA abundance for membrane transporters Mct8, Mct10, and organic anion-transporting polypeptides (Oatps) in a teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 167, 77–89. doi:10.1016/j.cbpa.2013.09.019
- Nambiar, V., Jagtap, V.S., Sarathi, V., Lila, A.R., Kamalanathan, S., Bandgar, T.R., Menon, P.S., Shah, N.S., 2011. Prevalence and impact of thyroid disorders on maternal outcome in

- asian-Indian pregnant women. *J. Thyroid Res.* 2011, 429097.
doi:10.4061/2011/429097
- Namer, B., Handwerker, H.O., 2009. Translational nociceptor research as guide to human pain perceptions and pathophysiology. *Exp. Brain Res.* 196, 163–172. doi:10.1007/s00221-009-1777-6
- Nandi, R., Fitzgerald, M., 2005. Opioid analgesia in the newborn. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* 9, 105–108. doi:10.1016/j.ejpain.2004.05.005
- Narumi, S., Hasegawa, T., 2015. TSH resistance revisited [Review]. *Endocr. J.*
doi:10.1507/endocrj.EJ15-0131
- Nashed, M.G., Balenko, M.D., Singh, G., 2014. Cancer-induced oxidative stress and pain. *Curr. Pain Headache Rep.* 18, 384. doi:10.1007/s11916-013-0384-1
- Nazarpour, S., Ramezani Tehrani, F., Simbar, M., Azizi, F., 2015. Thyroid dysfunction and pregnancy outcomes. *Iran. J. Reprod. Med.* 13, 387–396.
- Negishi, T., Kawasaki, K., Sekiguchi, S., Ishii, Y., Kyuwa, S., Kuroda, Y., Yoshikawa, Y., 2005. Attention-deficit and hyperactive neurobehavioural characteristics induced by perinatal hypothyroidism in rats. *Behav. Brain Res.* 159, 323–331.
doi:10.1016/j.bbr.2004.11.012
- Negro, R., Schwartz, A., Gismondi, R., Tinelli, A., Mangieri, T., Stagnaro-Green, A., 2010. Increased pregnancy loss rate in thyroid antibody negative women with TSH levels between 2.5 and 5.0 in the first trimester of pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, E44-48. doi:10.1210/jc.2010-0340
- Negro, R., Stagnaro-Green, A., 2014a. Diagnosis and management of subclinical hypothyroidism in pregnancy. *BMJ* 349, g4929.
- Negro, R., Stagnaro-Green, A., 2014b. Diagnosis and management of subclinical hypothyroidism in pregnancy. *BMJ* 349, g4929.
- Nicholson, R., Dixon, A.K., Spanswick, D., Lee, K., 2005. Noradrenergic receptor mRNA expression in adult rat superficial dorsal horn and dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* 380, 316–321. doi:10.1016/j.neulet.2005.01.079
- Nieto, P.A., Peñaloza, H.F., Salazar-Echegarai, F.J., Castellanos, R.M., Cecilia Opazo, M., Venegas, L., Padilla, O., Kalergis, A.M., Riedel, C.A., Bueno, S.M., 2016. Gestational hypothyroidism improves the ability of the female offspring to clear *Streptococcus pneumoniae* infection and to recover from pneumococcal pneumonia. *Endocrinology* en20151957. doi:10.1210/en.2015-1957
- Olivan-Blázquez, B., Herrera-Mercadal, P., Puebla-Guedea, M., Pérez-Yus, M.-C., Andrés, E., Fayed, N., López-Del-Hoyo, Y., Magallon, R., Roca, M., Garcia-Campayo, J., 2014. Efficacy of memantine in the treatment of fibromyalgia: A double-blind, randomised, controlled trial with 6-month follow-up. *Pain* 155, 2517–2525.
doi:10.1016/j.pain.2014.09.004
- Oliveras, J.L., Guilbaud, G., Besson, J.M., 1979. A map of serotonergic structures involved in stimulation producing analgesia in unrestrained freely moving cats. *Brain Res.* 164, 317–322.
- Oliveras, J.L., Redjemi, F., Guilbaud, G., Besson, J.M., 1975. Analgesia induced by electrical stimulation of the inferior centralis nucleus of the raphe in the cat. *Pain* 1, 139–145.
- Ong, G.S.Y., Hadlow, N.C., Brown, S.J., Lim, E.M., Walsh, J.P., 2014a. Does the thyroid-stimulating hormone measured concurrently with first trimester biochemical screening tests predict adverse pregnancy outcomes occurring after 20 weeks gestation? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E2668-2672. doi:10.1210/jc.2014-1918
- Ong, G.S.Y., Hadlow, N.C., Brown, S.J., Lim, E.M., Walsh, J.P., 2014b. Does the thyroid-stimulating hormone measured concurrently with first trimester biochemical screening

- tests predict adverse pregnancy outcomes occurring after 20 weeks gestation? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E2668-2672. doi:10.1210/jc.2014-1918
- Ong, G.S.Y., Hadlow, N.C., Brown, S.J., Lim, E.M., Walsh, J.P., 2014c. Does the thyroid-stimulating hormone measured concurrently with first trimester biochemical screening tests predict adverse pregnancy outcomes occurring after 20 weeks gestation? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E2668-2672. doi:10.1210/jc.2014-1918
- Orozco, A., Navarrete-Ramírez, P., Olvera, A., García-G, C., 2014. 3,5-Diiodothyronine (T2) is on a role. A new hormone in search of recognition. *Gen. Comp. Endocrinol.* 203, 174–180. doi:10.1016/j.ygcen.2014.02.014
- Ossipov, M.H., Dussor, G.O., Porreca, F., 2010. Central modulation of pain. *J. Clin. Invest.* 120, 3779–3787. doi:10.1172/JCI43766
- Päkkilä, F., Männistö, T., Surcel, H.-M., Ruokonen, A., Bloigu, A., Pouta, A., Hartikainen, A.-L., Vääräsmäki, M., Järvelin, M.-R., Suvanto, E., 2013. Maternal thyroid dysfunction during pregnancy and thyroid function of her child in adolescence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 965–972. doi:10.1210/jc.2012-2028
- Panciera, D.L., Purswell, B.J., Kolster, K.A., 2007. Effect of short-term hypothyroidism on reproduction in the bitch. *Theriogenology* 68, 316–321. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.026
- Park, H.-J., Shaukat, S., Liu, X.-Z., Hahn, S.H., Naz, S., Ghosh, M., Kim, H.-N., Moon, S.-K., Abe, S., Tukamoto, K., Riazuddin, S., Kabra, M., Erdenetungalag, R., Radnaabazar, J., Khan, S., Pandya, A., Usami, S.-I., Nance, W.E., Wilcox, E.R., Riazuddin, S., Griffith, A.J., 2003. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J. Med. Genet.* 40, 242–248.
- Park, M.K., Sagong, B., Lee, J.D., Bae, S.-H., Lee, B., Choi, K.S., Choo, Y.-S., Lee, K.-Y., Kim, U.-K., 2014. A1555G homoplasmic mutation from A1555G heteroplasmic mother with Pendred syndrome. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 78, 1996–1999. doi:10.1016/j.ijporl.2014.08.009
- Paroder, V., Spencer, S.R., Paroder, M., Arango, D., Schwartz, S., Mariadason, J.M., Augenlicht, L.H., Eskandari, S., Carrasco, N., 2006. Na(+)/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: molecular characterization of SMCT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7270–7275. doi:10.1073/pnas.0602365103
- Pascual, A., Aranda, A., 2013. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3908–3916. doi:10.1016/j.bbagen.2012.03.012
- Pasquini, J.M., Adamo, A.M., 1994. Thyroid hormones and the central nervous system. *Dev. Neurosci.* 16, 1–8.
- Patel, J., Landers, K., Li, H., Mortimer, R.H., Richard, K., 2011. Thyroid hormones and fetal neurological development. *J. Endocrinol.* 209, 1–8. doi:10.1530/JOE-10-0444
- Patel, J., Landers, K., Li, H., Mortimer, R.H., Richard, K., 2011. Delivery of maternal thyroid hormones to the fetus. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 22, 164–170. doi:10.1016/j.tem.2011.02.002
- Pathak, A., Sinha, R.A., Mohan, V., Mitra, K., Godbole, M.M., 2011. Maternal thyroid hormone before the onset of fetal thyroid function regulates reelin and downstream signaling cascade affecting neocortical neuronal migration. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 21, 11–21. doi:10.1093/cercor/bhq052
- Pathan, H., Williams, J., 2012. Basic opioid pharmacology: an update. *Br. J. Pain* 6, 11–16. doi:10.1177/2049463712438493
- Pearce, E.N., Stagnaro-Green, A., 2010. Hypothyroidism in pregnancy: do guidelines alter practice? *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 20, 241–242. doi:10.1089/thy.2010.0003

- Pegg, C.C., He, C., Stroink, A.R., Kattner, K.A., Wang, C.X., 2010. Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. *J. Neurosci. Methods* 187, 8–12. doi:10.1016/j.jneumeth.2009.12.002
- Peres Klein, C., Rodrigues Cintra, M., Binda, N., Montijo Diniz, D., Gomez, M.V., Souto, A.A., de Souza, A.H., 2016. Coadministration of Resveratrol and Rice Oil Mitigates Nociception and Oxidative State in a Mouse Fibromyalgia-Like Model. *Pain Res. Treat.* 2016, 3191638. doi:10.1155/2016/3191638
- Perrone, S., Santacroce, A., Picardi, A., Buonocore, G., 2016. Fetal programming and early identification of newborns at high risk of free radical-mediated diseases. *World J. Clin. Pediatr.* 5, 172–181. doi:10.5409/wjcp.v5.i2.172
- Pertovaara, A., 2006. Noradrenergic pain modulation. *Prog. Neurobiol.* 80, 53–83. doi:10.1016/j.pneurobio.2006.08.001
- Pfarr, N., Korsch, E., Kaspers, S., Herbst, A., Stach, A., Zimmer, C., Pohlenz, J., 2006. Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 65, 810–815. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02672.x
- Piehl, S., Heberer, T., Balizs, G., Scanlan, T.S., Smits, R., Kokscho, B., Köhrle, J., 2008. Thyronamines are isozyme-specific substrates of deiodinases. *Endocrinology* 149, 3037–3045. doi:10.1210/en.2007-1678
- Pierce, P.A., Xie, G.X., Levine, J.D., Peroutka, S.J., 1996. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70, 553–559.
- Pitale, S., Sahasrabudhe, A., 2011. Fetal origin of vascular aging. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 15 Suppl 4, S289-297. doi:10.4103/2230-8210.86971
- Pizzagalli, F., Hagenbuch, B., Stieger, B., Klenk, U., Folkers, G., Meier, P.J., 2002. Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 16, 2283–2296. doi:10.1210/me.2001-0309
- Plateroti, M., Gauthier, K., Domon-Dell, C., Freund, J.N., Samarut, J., Chassande, O., 2001. Functional interference between thyroid hormone receptor alpha (TRalpha) and natural truncated TRDeltaalpha isoforms in the control of intestine development. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4761–4772. doi:10.1128/MCB.21.14.4761-4772.2001
- Ploghaus, A., Tracey, I., Gati, J.S., Clare, S., Menon, R.S., Matthews, P.M., Rawlins, J.N., 1999. Dissociating pain from its anticipation in the human brain. *Science* 284, 1979–1981.
- Pop, V.J., Brouwers, E.P., Vader, H.L., Vulsma, T., van Baar, A.L., de Vijlder, J.J., 2003. Maternal hypothyroxinaemia during early pregnancy and subsequent child development: a 3-year follow-up study. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 59, 282–288.
- Pop, V.J., Kuijpers, J.L., van Baar, A.L., Verkerk, G., van Son, M.M., de Vijlder, J.J., Vulsma, T., Wiersinga, W.M., Drexhage, H.A., Vader, H.L., 1999. Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 50, 149–155.
- Price, N.T., Jackson, V.N., Halestrap, A.P., 1998. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem. J.* 329 (Pt 2), 321–328.
- Privalsky, M.L., 2004. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu. Rev. Physiol.* 66, 315–360. doi:10.1146/annurev.physiol.66.032802.155556
- Qian, J., Brown, S.D., Carlton, S.M., 1996. Systemic ketamine attenuates nociceptive behaviors in a rat model of peripheral neuropathy. *Brain Res.* 715, 51–62. doi:10.1016/0006-8993(95)01452-7
- Rada, B., Leto, T.L., 2008. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib. Microbiol.* 15, 164–187. doi:10.1159/000136357

- Rahaman, S.O., Ghosh, S., Mohanakumar, K.P., Das, S., Sarkar, P.K., 2001. Hypothyroidism in the developing rat brain is associated with marked oxidative stress and aberrant intraneuronal accumulation of neurofilaments. *Neurosci. Res.* 40, 273–279.
- Rahman, W., Bauer, C.S., Bannister, K., Vonsy, J.-L., Dolphin, A.C., Dickenson, A.H., 2009. Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. *Mol. Pain* 5, 45. doi:10.1186/1744-8069-5-45
- Rainville, P., Carrier, B., Hofbauer, R.K., Bushnell, M.C., Duncan, G.H., 1999. Dissociation of sensory and affective dimensions of pain using hypnotic modulation. *Pain* 82, 159–171.
- Raja, S.N., Meyer, R.A., Campbell, J.N., 1988. Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology* 68, 571–590.
- Rasmussen, S.A., Yazdy, M.M., Carmichael, S.L., Jamieson, D.J., Canfield, M.A., Honein, M.A., 2007. Maternal thyroid disease as a risk factor for craniosynostosis. *Obstet. Gynecol.* 110, 369–377. doi:10.1097/01.AOG.0000270157.88896.76
- Reardon, W., Coffey, R., Phelps, P.D., Luxon, L.M., Stephens, D., Kendall-Taylor, P., Britton, K.E., Grossman, A., Trembath, R., 1997. Pendred syndrome--100 years of underascertainment? *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* 90, 443–447.
- Reddy, S.V., Yaksh, T.L., 1980. Spinal noradrenergic terminal system mediates antinociception. *Brain Res.* 189, 391–401.
- Refetoff, S., Dumitrescu, A.M., 2007. Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 21, 277–305. doi:10.1016/j.beem.2007.03.005
- Rentoumis, A., Chatterjee, V.K., Madison, L.D., Datta, S., Gallagher, G.D., Degroot, L.J., Jameson, J.L., 1990. Negative and positive transcriptional regulation by thyroid hormone receptor isoforms. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 4, 1522–1531. doi:10.1210/mend-4-10-1522
- Resch, U., Helsel, G., Tatzber, F., Sinzinger, H., 2002. Antioxidant status in thyroid dysfunction. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40, 1132–1134. doi:10.1515/CCLM.2002.198
- Reynolds, D.V., 1969. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 164, 444–445.
- Riera, R., 2015. Selective serotonin reuptake inhibitors for fibromyalgia syndrome. *São Paulo Med. J. Rev. Paul. Med.* 133, 454. doi:10.1590/1516-3180.20151335T1
- Roberts, L.M., Black, D.S., Raman, C., Woodford, K., Zhou, M., Haggerty, J.E., Yan, A.T., Cwirla, S.E., Grindstaff, K.K., 2008. Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience* 155, 423–438. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.06.015
- Roberts, L.M., Woodford, K., Zhou, M., Black, D.S., Haggerty, J.E., Tate, E.H., Grindstaff, K.K., Mengesha, W., Raman, C., Zerangue, N., 2008. Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology* 149, 6251–6261. doi:10.1210/en.2008-0378
- Rodriguez, A.-M., Perron, B., Lacroix, L., Caillou, B., Leblanc, G., Schlumberger, M., Bidart, J.-M., Pourcher, T., 2002. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 3500–3503. doi:10.1210/jcem.87.7.8797
- Rosenthal, M.J., Hunt, W.C., Garry, P.J., Goodwin, J.S., 1987. Thyroid failure in the elderly. Microsomal antibodies as discriminant for therapy. *JAMA* 258, 209–213.
- Roti, E., Gnudi, A., Braverman, L.E., 1983. The placental transport, synthesis and metabolism of hormones and drugs which affect thyroid function. *Endocr. Rev.* 4, 131–149. doi:10.1210/edrv-4-2-131

- Royaux, I.E., Suzuki, K., Mori, A., Katoh, R., Everett, L.A., Kohn, L.D., Green, E.D., 2000. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 141, 839–845. doi:10.1210/endo.141.2.7303
- Rozisky, J.R., Dantas, G., Adachi, L.S., Alves, V.S., Ferreira, M.B.C., Sarkis, J.J.F., Torres, I.L.D.S., 2008. Long-term effect of morphine administration in young rats on the analgesic opioid response in adult life. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 26, 561–565. doi:10.1016/j.ijdevneu.2008.05.005
- Saad, A.F., Dickerson, J., Kechichian, T.B., Yin, H., Gamble, P., Salazar, A., Patrikeev, I., Motamedi, M., Saade, G.R., Costantine, M.M., 2016. High-fructose diet in pregnancy leads to fetal programming of hypertension, insulin resistance, and obesity in adult offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.* doi:10.1016/j.ajog.2016.03.038
- Saba, A., Chiellini, G., Frascarelli, S., Marchini, M., Ghelardoni, S., Raffaelli, A., Tonacchera, M., Vitti, P., Scanlan, T.S., Zucchi, R., 2010. Tissue distribution and cardiac metabolism of 3-iodothyronamine. *Endocrinology* 151, 5063–5073. doi:10.1210/en.2010-0491
- Saberi, M., Sterling, F.H., Utiger, R.D., 1975. Reduction in extrathyroidal triiodothyronine production by propylthiouracil in man. *J. Clin. Invest.* 55, 218–223. doi:10.1172/JCI107924
- Sagar, G.D.V., Gereben, B., Callebaut, I., Mornon, J.-P., Zeöld, A., Curcio-Morelli, C., Harney, J.W., Luongo, C., Mulcahey, M.A., Larsen, P.R., Huang, S.A., Bianco, A.C., 2008. The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 1382–1393. doi:10.1210/me.2007-0490
- Sagar, G.D.V., Gereben, B., Callebaut, I., Mornon, J.-P., Zeöld, A., da Silva, W.S., Luongo, C., Dentice, M., Tente, S.M., Freitas, B.C.G., Harney, J.W., Zavacki, A.M., Bianco, A.C., 2007. Ubiquitination-induced conformational change within the deiodinase dimer is a switch regulating enzyme activity. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4774–4783. doi:10.1128/MCB.00283-07
- Sagen, J., Proudfit, H.K., 1984. Effect of intrathecally administered noradrenergic antagonists on nociception in the rat. *Brain Res.* 310, 295–301.
- Sagong, B., Seok, J.H., Kwon, T.-J., Kim, U.-K., Lee, S.-H., Lee, K.-Y., 2012. A novel insertion-induced frameshift mutation of the SLC26A4 gene in a Korean family with Pendred syndrome. *Gene* 508, 135–139. doi:10.1016/j.gene.2012.07.033
- Sahu, M.T., Das, V., Mittal, S., Agarwal, A., Sahu, M., 2010. Overt and subclinical thyroid dysfunction among Indian pregnant women and its effect on maternal and fetal outcome. *Arch. Gynecol. Obstet.* 281, 215–220. doi:10.1007/s00404-009-1105-1
- Saito, A., Pietromonaco, S., Loo, A.K., Farquhar, M.G., 1994. Complete cloning and sequencing of rat gp330/“megalin,” a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9725–9729.
- Saki, F., Dabbaghmanesh, M.H., Ghaemi, S.Z., Forouhari, S., Ranjbar Omrani, G., Bakhshayeshkaram, M., 2014. Thyroid function in pregnancy and its influences on maternal and fetal outcomes. *Int. J. Endocrinol. Metab.* 12, e19378. doi:10.5812/ijem.19378
- Sala-Roca, J., Martí-Carbonell, M.A., Garau, A., Darbra, S., Balada, F., 2002. Effects of dysthyroidism in plus maze and social interaction tests. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72, 643–650.
- Sandler, B., Webb, P., Apriletti, J.W., Huber, B.R., Togashi, M., Cunha Lima, S.T., Juric, S., Nilsson, S., Wagner, R., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., 2004. Thyroxine-thyroid hormone receptor interactions. *J. Biol. Chem.* 279, 55801–55808. doi:10.1074/jbc.M410124200
- Santos, S.O., Loureiro, S.M.A., Alves, I.G.N., Jesus, C.S. de, Santos, P.R. dos, Santos, M.R.V. dos, Dias, D.P.M., Santana-Filho, V.J., Badauê-Passos, D., Jr, 2012. Experimental gestational

- hypothyroidism evokes hypertension in adult offspring rats. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 170, 36–41. doi:10.1016/j.autneu.2012.07.004
- Sasaki, M., Obata, H., Kawahara, K., Saito, S., Goto, F., 2006. Peripheral 5-HT_{2A} receptor antagonism attenuates primary thermal hyperalgesia and secondary mechanical allodynia after thermal injury in rats. *Pain* 122, 130–136. doi:10.1016/j.pain.2006.01.021
- Sato, E., Nakashima, T., Miura, Y., Furuhashi, A., Nakayama, A., Mori, N., Murakami, H., Naganawa, S., Tadokoro, M., 2001. Phenotypes associated with replacement of His by Arg in the Pendred syndrome gene. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 145, 697–703.
- Sawin, C.T., Castelli, W.P., Hershman, J.M., McNamara, P., Bacharach, P., 1985. The aging thyroid. Thyroid deficiency in the Framingham Study. *Arch. Intern. Med.* 145, 1386–1388.
- Scanlan, T.S., Suchland, K.L., Hart, M.E., Chiellini, G., Huang, Y., Kruzich, P.J., Frascarelli, S., Crossley, D.A., Bunzow, J.R., Ronca-Testoni, S., Lin, E.T., Hatton, D., Zucchi, R., Grandy, D.K., 2004. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nat. Med.* 10, 638–642. doi:10.1038/nm1051
- Schmelz, M., 2009. Translating nociceptive processing into human pain models. *Exp. Brain Res.* 196, 173–178. doi:10.1007/s00221-009-1809-2
- Schmitt, H., Le Douarec, J.C., Petillot, N., 1974. Antinociceptive effects of some alpha-sympathomimetic agents. *Neuropharmacology* 13, 289–294.
- Schneider, M.J., Fiering, S.N., Thai, B., Wu, S., St Germain, E., Parlow, A.F., St Germain, D.L., Galton, V.A., 2006. Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (*Dio1*) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology* 147, 580–589. doi:10.1210/en.2005-0739
- Schnell, C., Shahmoradi, A., Wichert, S.P., Mayerl, S., Hagos, Y., Heuer, H., Rossner, M.J., Hülsmann, S., 2015. The multispecific thyroid hormone transporter OATP1C1 mediates cell-specific sulforhodamine 101-labeling of hippocampal astrocytes. *Brain Struct. Funct.* 220, 193–203. doi:10.1007/s00429-013-0645-0
- Schnell, C., Ulucan, C., Ellrich, J., 2002. Atypical on-, off- and neutral cells in the rostral ventromedial medulla oblongata in rat. *Exp. Brain Res.* 145, 64–75. doi:10.1007/s00221-002-1093-x
- Schroeder, A.C., Privalsky, M.L., 2014. Thyroid hormones, t₃ and t₄, in the brain. *Front. Endocrinol.* 5, 40. doi:10.3389/fendo.2014.00040
- Schueler, P.A., Schwartz, H.L., Strait, K.A., Mariash, C.N., Oppenheimer, J.H., 1990. Binding of 3,5,3'-triiodothyronine (T₃) and its analogs to the in vitro translational products of c-erbA protooncogenes: differences in the affinity of the alpha- and beta-forms for the acetic acid analog and failure of the human testis and kidney alpha-2 products to bind T₃. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 4, 227–234. doi:10.1210/mend-4-2-227
- Schwartz, H.L., Strait, K.A., Ling, N.C., Oppenheimer, J.H., 1992. Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity. *J. Biol. Chem.* 267, 11794–11799.
- Sedaghat, K., Zahediasl, S., Ghasemi, A., 2015. Gestational hypothyroidism-induced changes in L-type calcium channels of rat aorta smooth muscle and their impact on the responses to vasoconstrictors. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 18, 172–179.
- Segni, M., Leonardi, E., Mazzoncini, B., Pucarelli, I., Pasquino, A.M., 1999. Special features of Graves' disease in early childhood. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 9, 871–877. doi:10.1089/thy.1999.9.871
- Sen, S., Chakraborty, R., Rekha, B., Revathi, D., Ayyanna, S.C., Hemalatha, G., Kumar Reddy, G.A., Hyndavi, S., Ikhyatha Babu, P.J., Prakash, P.R., Sridhar, C., 2013. Anti-

- inflammatory, analgesic, and antioxidant activities of *Pisonia aculeata*: folk medicinal use to scientific approach. *Pharm. Biol.* 51, 426–432.
doi:10.3109/13880209.2012.738331
- Senese, R., Cioffi, F., de Lange, P., Goglia, F., Lanni, A., 2014. Thyroid: biological actions of “nonclassical” thyroid hormones. *J. Endocrinol.* 221, R1-12. doi:10.1530/JOE-13-0573
- Senou, M., Khalifa, C., Thimmesch, M., Jouret, F., Devuyst, O., Col, V., Audinot, J.-N., Lipnik, P., Moreno, J.C., Van Sande, J., Dumont, J.E., Many, M.-C., Colin, I.M., Gérard, A.-C., 2010. A coherent organization of differentiation proteins is required to maintain an appropriate thyroid function in the Pendred thyroid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 4021–4030. doi:10.1210/jc.2010-0228
- Setian, N.S., 2007. Hypothyroidism in children: diagnosis and treatment. *J. Pediatr. (Rio J.)* 83, S209-216. doi:doi:10.2223/JPED.1716
- Sgarbi, J.A., Teixeira, P.F.S., Maciel, L.M.Z., Mazeto, G.M.F.S., Vaisman, M., Junior, M., M, R., Ward, L.S., 2013. The Brazilian consensus for the clinical approach and treatment of subclinical hypothyroidism in adults: recommendations of the thyroid Department of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism. *Arq. Bras. Endocrinol. Amp Metabol.* 57, 166–183. doi:10.1590/S0004-27302013000300003
- Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A., Brown, M., 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103, 843–852.
- Sharlin, D.S., Visser, T.J., Forrest, D., 2011. Developmental and cell-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse cochlea. *Endocrinology* 152, 5053–5064. doi:10.1210/en.2011-1372
- Sharma, D., Fondell, J.D., 2002. Ordered recruitment of histone acetyltransferases and the TRAP/Mediator complex to thyroid hormone-responsive promoters in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7934–7939. doi:10.1073/pnas.122004799
- Sharma, D., Fondell, J.D., 2000. Temporal formation of distinct thyroid hormone receptor coactivator complexes in HeLa cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 14, 2001–2009. doi:10.1210/mend.14.12.0567
- Sheehan, P.M., Nankervis, A., Araujo Júnior, E., Da Silva Costa, F., 2015. Maternal Thyroid Disease and Preterm Birth: Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 4325–4331. doi:10.1210/jc.2015-3074
- Shi, T.S., Winzer-Serhan, U., Leslie, F., Hökfelt, T., 2000. Distribution and regulation of alpha(2)-adrenoceptors in rat dorsal root ganglia. *Pain* 84, 319–330.
- Shibutani, M., Woo, G.-H., Fujimoto, H., Saegusa, Y., Takahashi, M., Inoue, K., Hirose, M., Nishikawa, A., 2009. Assessment of developmental effects of hypothyroidism in rats from in utero and lactation exposure to anti-thyroid agents. *Reprod. Toxicol. Elmsford N* 28, 297–307. doi:10.1016/j.reprotox.2009.04.011
- Shuaib, A., Ijaz, S., Hemmings, S., Galazka, P., Ishaqzay, R., Liu, L., Ravindran, J., Miyashita, H., 1994. Decreased glutamate release during hypothyroidism may contribute to protection in cerebral ischemia. *Exp. Neurol.* 128, 260–265. doi:10.1006/exnr.1994.1135
- Silva, F.G. da, Giannocco, G., Luchessi, A.D., Curi, R., Nunes, M.T., 2010. T3 acutely increases GH mRNA translation rate and GH secretion in hypothyroid rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 317, 1–7. doi:10.1016/j.mce.2009.12.005
- Silva, F.G. da, Giannocco, G., Santos, M.F., Nunes, M.T., 2006. Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: potential repercussions in growth hormone synthesis and secretion. *Endocrinology* 147, 5777–5785. doi:10.1210/en.2006-0110

- Sinha, R.A., Pathak, A., Mohan, V., Bandyopadhyay, S., Rastogi, L., Godbole, M.M., 2008. Maternal thyroid hormone: a strong repressor of neuronal nitric oxide synthase in rat embryonic neocortex. *Endocrinology* 149, 4396–4401. doi:10.1210/en.2007-1617
- Sirakov, M., Kress, E., Nadjar, J., Plateroti, M., 2014. Thyroid hormones and their nuclear receptors: new players in intestinal epithelium stem cell biology? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 71, 2897–2907. doi:10.1007/s00018-014-1586-3
- Sirakov, M., Skah, S., Nadjar, J., Plateroti, M., 2013. Thyroid hormone's action on progenitor/stem cell biology: new challenge for a classic hormone? *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3917–3927. doi:10.1016/j.bbagen.2012.07.014
- Sluka, K.A., 2000. Systemic morphine in combination with TENS produces an increased antihyperalgesia in rats with acute inflammation. *J. Pain Off. J. Am. Pain Soc.* 1, 204–211. doi:10.1054/jpai.2000.7149
- Sluka, K.A., Westlund, K.N., 1992. Spinal projections of the locus coeruleus and the nucleus subcoeruleus in the Harlan and the Sasco Sprague-Dawley rat. *Brain Res.* 579, 67–73.
- Smit, B.J., Kok, J.H., Vulsma, T., Briët, J.M., Boer, K., Wiersinga, W.M., 2000. Neurologic development of the newborn and young child in relation to maternal thyroid function. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 89, 291–295.
- Sobrero, G., Muñoz, L., Bazzara, L., Martin, S., Silvano, L., Iorkansky, S., Bergoglio, L., Spencer, C., Miras, M., 2007. Thyroglobulin reference values in a pediatric infant population. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 17, 1049–1054. doi:10.1089/thy.2007.0059
- Solis, J.C., Valverde, C., 2006. [Neonatal hypothyroidism. pathophysiogenic, molecular and clinical aspects]. *Rev. Investig. Clínica Organo Hosp. Enfermedades Nutr.* 58, 318–334.
- Song, L., Wu, C., Zuo, Y., 2015. Melatonin prevents morphine-induced hyperalgesia and tolerance in rats: role of protein kinase C and N-methyl-D-aspartate receptors. *BMC Anesthesiol.* 15, 12. doi:10.1186/1471-2253-15-12
- Sorkin, L.S., Wallace, M.S., 1999. Acute pain mechanisms. *Surg. Clin. North Am.* 79, 213–229.
- Souza, P.C.T., Puhl, A.C., Martínez, L., Aparício, R., Nascimento, A.S., Figueira, A.C.M., Nguyen, P., Webb, P., Skaf, M.S., Polikarpov, I., 2014. Identification of a new hormone-binding site on the surface of thyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 28, 534–545. doi:10.1210/me.2013-1359
- St Germain, D.L., Galton, V.A., Hernandez, A., 2009. Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology* 150, 1097–1107. doi:10.1210/en.2008-1588
- Stagnaro-Green, A., 2009. Maternal thyroid disease and preterm delivery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 21–25. doi:10.1210/jc.2008-1288
- Stagnaro-Green, A., Abalovich, M., Alexander, E., Azizi, F., Mestman, J., Negro, R., Nixon, A., Pearce, E.N., Soldin, O.P., Sullivan, S., Wiersinga, W., American Thyroid Association Taskforce on Thyroid Disease During Pregnancy and Postpartum, 2011. Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* 21, 1081–1125. doi:10.1089/thy.2011.0087
- Stamford, J.A., 1995. Descending control of pain. *Br. J. Anaesth.* 75, 217–227.
- Stathatos, N., 2012. Thyroid Physiology. *Med. Clin. North Am.* 96, 165–173. doi:10.1016/j.mcna.2012.01.007
- Staud, R., 2013. The important role of CNS facilitation and inhibition for chronic pain. *Int. J. Clin. Rheumatol.* 8, 639–646. doi:10.2217/ijr.13.57
- Stricker, R., Echenard, M., Eberhart, R., Chevaller, M.-C., Perez, V., Quinn, F.A., Stricker, R., 2007. Evaluation of maternal thyroid function during pregnancy: the importance of using gestational age-specific reference intervals. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 157, 509–514. doi:10.1530/EJE-07-0249

- Struhl, K., 2001. Gene regulation. A paradigm for precision. *Science* 293, 1054–1055. doi:10.1126/science.1064050
- Su, P.-Y., Huang, K., Hao, J.-H., Xu, Y.-Q., Yan, S.-Q., Li, T., Xu, Y.-H., Tao, F.-B., 2011. Maternal thyroid function in the first twenty weeks of pregnancy and subsequent fetal and infant development: a prospective population-based cohort study in China. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 3234–3241. doi:10.1210/jc.2011-0274
- Sugiyama, D., Kusuhara, H., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Nozaki, Y., Aburatani, H., Sugiyama, Y., 2003. Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *J. Biol. Chem.* 278, 43489–43495. doi:10.1074/jbc.M306933200
- Sui, L., Gilbert, M.E., 2003. Pre- and postnatal propylthiouracil-induced hypothyroidism impairs synaptic transmission and plasticity in area CA1 of the neonatal rat hippocampus. *Endocrinology* 144, 4195–4203. doi:10.1210/en.2003-0395
- Sun, Y., Liu, Y., Zhang, L., Ye, Y., Lin, L., Li, Y., Yan, Y., Chen, Z., 2014. Expression of organic anion transporting polypeptide 1c1 and monocarboxylate transporter 8 in the rat placental barrier and the compensatory response to thyroid dysfunction. *PLoS One* 9, e96047. doi:10.1371/journal.pone.0096047
- Sundari, S.B.T., Venu, L., Sunita, Y., Raghunath, M., 2007. Chronic maternal dietary iodine deficiency but not thiocyanate feeding affects maternal reproduction and postnatal performance of the rat. *Indian J. Exp. Biol.* 45, 603–609.
- Suzuki, R., Rygh, L.J., Dickenson, A.H., 2004. Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 613–617. doi:10.1016/j.tips.2004.10.002
- Svoboda, M., Riha, J., Wlcek, K., Jaeger, W., Thalhammer, T., 2011. Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function. *Curr. Drug Metab.* 12, 139–153.
- Tagami, T., Kopp, P., Johnson, W., Arseven, O.K., Jameson, J.L., 1998. The thyroid hormone receptor variant alpha2 is a weak antagonist because it is deficient in interactions with nuclear receptor corepressors. *Endocrinology* 139, 2535–2544. doi:10.1210/endo.139.5.6011
- Tagami, T., Yamamoto, H., Moriyama, K., Sawai, K., Usui, T., Shimatsu, A., Naruse, M., 2010. Identification of a novel human thyroid hormone receptor beta isoform as a transcriptional modulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 983–988. doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.038
- Taylor, P.N., Minassian, C., Rehman, A., Iqbal, A., Draman, M.S., Hamilton, W., Dunlop, D., Robinson, A., Vaidya, B., Lazarus, J.H., Thomas, S., Dayan, C.M., Okosieme, O.E., 2014. TSH levels and risk of miscarriage in women on long-term levothyroxine: a community-based study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 3895–3902. doi:10.1210/jc.2014-1954
- Tellechea, M., Gianotti, T.F., Alvariñas, J., González, C.D., Sookoian, S., Pirola, C.J., 2015. Telomere length in the two extremes of abnormal fetal growth and the programming effect of maternal arterial hypertension. *Sci. Rep.* 5, 7869. doi:10.1038/srep07869
- The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th Edition | George Paxinos, Charles Watson | ISBN 9780125476126 [WWW Document], n.d. URL <http://store.elsevier.com/The-Rat-Brain-in-Stereotaxic-Coordinates/George-Paxinos/isbn-9780125476126/> (accessed 4.8.16).
- Thompson, C.C., Potter, G.B., 2000. Thyroid hormone action in neural development. *Cereb. Cortex N. Y. N* 10, 939–945.
- Thorpe-Beeston, J.G., Nicolaides, K.H., Felton, C.V., Butler, J., McGregor, A.M., 1991. Maturation of the secretion of thyroid hormone and thyroid-stimulating hormone in the fetus. *N. Engl. J. Med.* 324, 532–536. doi:10.1056/NEJM199102213240805

- Todd, A.J., Millar, J., 1983. Receptive fields and responses to ionophoretically applied noradrenaline and 5-hydroxytryptamine of units recorded in laminae I-III of cat dorsal horn. *Brain Res.* 288, 159–167.
- Tohyama, K., Kusuhashi, H., Sugiyama, Y., 2004. Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier. *Endocrinology* 145, 4384–4391. doi:10.1210/en.2004-0058
- Tölle, T.R., Kaufmann, T., Siessmeier, T., Lautenbacher, S., Berthele, A., Munz, F., Ziegler, W., Willoch, F., Schwaiger, M., Conrad, B., Bartenstein, P., 1999. Region-specific encoding of sensory and affective components of pain in the human brain: a positron emission tomography correlation analysis. *Ann. Neurol.* 45, 40–47.
- Tong, Z., Xiaowen, Z., Baomin, C., Aihua, L., Yingying, Z., Weiping, T., Zhongyan, S., 2016. The Effect of Subclinical Maternal Thyroid Dysfunction and Autoimmunity on Intrauterine Growth Restriction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 95, e3677. doi:10.1097/MD.00000000000003677
- Tortosa, F., 2011. [Subclinical thyroid dysfunction in pregnancy]. *Endocrinol. Nutr. Órgano Soc. Esp. Endocrinol. Nutr.* 58, 255–257. doi:10.1016/j.endonu.2011.05.001
- Toyoda, N., Berry, M.J., Harney, J.W., Larsen, P.R., 1995. Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1). *J. Biol. Chem.* 270, 12310–12318.
- Trajkovic, M., Visser, T.J., Mittag, J., Horn, S., Lukas, J., Darras, V.M., Raivich, G., Bauer, K., Heuer, H., 2007. Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *J. Clin. Invest.* 117, 627–635. doi:10.1172/JCI28253
- Trajkovic-Arsic, M., Visser, T.J., Darras, V.M., Friesema, E.C.H., Schlott, B., Mittag, J., Bauer, K., Heuer, H., 2010. Consequences of monocarboxylate transporter 8 deficiency for renal transport and metabolism of thyroid hormones in mice. *Endocrinology* 151, 802–809. doi:10.1210/en.2009-1053
- Trescot, A.M., Datta, S., Lee, M., Hansen, H., 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11, S133-153.
- Trueba, S.S., Augé, J., Mattei, G., Etchevers, H., Martinovic, J., Czernichow, P., Vekemans, M., Polak, M., Attié-Bitach, T., 2005. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 455–462. doi:10.1210/jc.2004-1358
- Tsukamoto, K., Suzuki, H., Harada, D., Namba, A., Abe, S., Usami, S., 2003. Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 11, 916–922. doi:10.1038/sj.ejhg.5201073
- Tsuruoka, M., Willis, W.D., 1996a. Descending modulation from the region of the locus coeruleus on nociceptive sensitivity in a rat model of inflammatory hyperalgesia. *Brain Res.* 743, 86–92.
- Tsuruoka, M., Willis, W.D., 1996b. Bilateral lesions in the area of the nucleus locus coeruleus affect the development of hyperalgesia during carrageenan-induced inflammation. *Brain Res.* 726, 233–236.
- Tunbridge, W.M., Evered, D.C., Hall, R., Appleton, D., Brewis, M., Clark, F., Evans, J.G., Young, E., Bird, T., Smith, P.A., 1977. The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham survey. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 7, 481–493.
- Vaidya, B., Anthony, S., Bilous, M., Shields, B., Drury, J., Hutchison, S., Bilous, R., 2007. Detection of thyroid dysfunction in early pregnancy: Universal screening or targeted

- high-risk case finding? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 203–207. doi:10.1210/jc.2006-1748
- van den Hove, M.-F., Croizet-Berger, K., Jouret, F., Guggino, S.E., Guggino, W.B., Devuyst, O., Courtoy, P.J., 2006. The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. *Endocrinology* 147, 1287–1296. doi:10.1210/en.2005-1149
- van der Deure, W.M., Peeters, R.P., Visser, T.J., 2010. Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. *J. Mol. Endocrinol.* 44, 1–11. doi:10.1677/JME-09-0042
- Van Herck, S.L.J., Delbaere, J., Bourgeois, N.M.A., McAllan, B.M., Richardson, S.J., Darras, V.M., 2015. Expression of thyroid hormone transporters and deiodinases at the brain barriers in the embryonic chicken: Insights into the regulation of thyroid hormone availability during neurodevelopment. *Gen. Comp. Endocrinol.* 214, 30–39. doi:10.1016/j.ygcen.2015.02.021
- Van Herck, S.L.J., Geysens, S., Delbaere, J., Darras, V.M., 2013. Regulators of thyroid hormone availability and action in embryonic chicken brain development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 190, 96–104. doi:10.1016/j.ygcen.2013.05.003
- van Wijk, N., Rijntjes, E., van de Heijning, B.J.M., 2008. Perinatal and chronic hypothyroidism impair behavioural development in male and female rats. *Exp. Physiol.* 93, 1199–1209. doi:10.1113/expphysiol.2008.042416
- Vanderpump, M.P., Ahlquist, J.A., Franklyn, J.A., Clayton, R.N., 1996. Consensus statement for good practice and audit measures in the management of hypothyroidism and hyperthyroidism. The Research Unit of the Royal College of Physicians of London, the Endocrinology and Diabetes Committee of the Royal College of Physicians of London, and the Society for Endocrinology. *BMJ* 313, 539–544.
- Vanderpump, M.P., Tunbridge, W.M., French, J.M., Appleton, D., Bates, D., Clark, F., Grimley Evans, J., Hasan, D.M., Rodgers, H., Tunbridge, F., 1995. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 43, 55–68.
- Vara, H., Martínez, B., Santos, A., Colino, A., 2002. Thyroid hormone regulates neurotransmitter release in neonatal rat hippocampus. *Neuroscience* 110, 19–28.
- Velázquez, K.T., Mohammad, H., Sweitzer, S.M., 2007. Protein kinase C in pain: Involvement of multiple isoforms. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 55, 578–589. doi:10.1016/j.phrs.2007.04.006
- Vella, K.R., Ramadoss, P., Costa-E-Sousa, R.H., Astapova, I., Ye, F.D., Holtz, K.A., Harris, J.C., Hollenberg, A.N., 2014. Thyroid hormone signaling in vivo requires a balance between coactivators and corepressors. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1564–1575. doi:10.1128/MCB.00129-14
- Venditti, P., Balestrieri, M., Di Meo, S., De Leo, T., 1997. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J. Endocrinol.* 155, 151–157.
- Venditti, P., Daniele, M.C., Masullo, P., Di Meo, S., 1999. Antioxidant-sensitive triiodothyronine effects on characteristics of rat liver mitochondrial population. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 9, 38–52. doi:16301
- Venditti, P., Di Meo, S., 2006. Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 414–434. doi:10.1007/s00018-005-5457-9
- Verloop, H., Dekkers, O.M., Peeters, R.P., Schoones, J.W., Smit, J.W.A., 2014. Genetics in endocrinology: genetic variation in deiodinases: a systematic review of potential clinical effects in humans. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 171, R123–135. doi:10.1530/EJE-14-0302

- Vieira, J.G.H., Kanashiro, I., Tachibana, T.T., Ghiringhello, M.T., Hauache, O.M., Maciel, R.M.B., 2004. [Free thyroxine values during pregnancy]. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 48, 305–309. doi:/S0004-27302004000200015
- Vila, L., Velasco, I., González, S., Morales, F., Sánchez, E., Lailla, J.M., Martinez-Astorquiza, T., Puig-Domingo, M., el Grupo de Trabajo de Trastornos por Deficiencia de Yodo y Disfunción Tiroidea de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición, Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2012. [Detection of thyroid dysfunction in pregnant women: universal screening is justified]. *Med. Clínica* 139, 509.e1-509.e11. doi:10.1016/j.medcli.2012.06.004
- Vila, L., Velasco, I., González, S., Morales, F., Sánchez, E., Torrejón, S., Soldevila, B., Stagnaro-Green, A., Puig-Domingo, M., 2014. Controversies in endocrinology: On the need for universal thyroid screening in pregnant women. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 170, R17-30. doi:10.1530/EJE-13-0561
- Villagelin, D., Comarella, A.P., Tiago, D.B., Ward, L.S., 2016. Management of gestational hypothyroidism: results of a Brazilian survey. *Arch. Endocrinol. Metab.* 60, 16–20. doi:10.1590/2359-3997000000069
- Visser, W.E., Friesema, E.C.H., Jansen, J., Visser, T.J., 2008. Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* 19, 50–56. doi:10.1016/j.tem.2007.11.003
- Visser, W.E., Friesema, E.C.H., Visser, T.J., 2011. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 25, 1–14. doi:10.1210/me.2010-0095
- Visser, W.E., Visser, T.J., 2012. Finding the way into the brain without MCT8. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97, 4362–4365. doi:10.1210/jc.2012-3759
- Visser, W.E., Wong, W.S., van Mullem, A.A.A., Friesema, E.C.H., Geyer, J., Visser, T.J., 2010. Study of the transport of thyroid hormone by transporters of the SLC10 family. *Mol. Cell. Endocrinol.* 315, 138–145. doi:10.1016/j.mce.2009.08.003
- Volpato, C.B., Nunes, M.T., 2001. Functional evidence for the presence of type II 5'-deiodinase in somatotropes and its adaptive role in hypothyroidism. *Neuroendocrinology* 74, 220–226. doi:54689
- Volpato, C.B., Nunes, M.T., 1994. Role of thyroid hormone in the control of growth hormone gene expression. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 27, 1269–1272.
- Vulsma, T., Gons, M.H., de Vijlder, J.J., 1989. Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *N. Engl. J. Med.* 321, 13–16. doi:10.1056/NEJM198907063210103
- Walitt, B., Urrútia, G., Nishishinya, M.B., Cantrell, S.E., Häuser, W., 2015. Selective serotonin reuptake inhibitors for fibromyalgia syndrome. *Cochrane Database Syst. Rev.* 6, CD011735. doi:10.1002/14651858.CD011735
- Wall, P.D., 1978. The gate control theory of pain mechanisms. A re-examination and re-statement. *Brain J. Neurol.* 101, 1–18.
- Wallis, K., Dudazy, S., van Hogerlinden, M., Nordström, K., Mittag, J., Vennström, B., 2010. The thyroid hormone receptor alpha1 protein is expressed in embryonic postmitotic neurons and persists in most adult neurons. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 24, 1904–1916. doi:10.1210/me.2010-0175
- Wang, S., Teng, W.P., Li, J.X., Wang, W.W., Shan, Z.Y., 2012. Effects of maternal subclinical hypothyroidism on obstetrical outcomes during early pregnancy. *J. Endocrinol. Invest.* 35, 322–325. doi:10.3275/7772
- Wang, W., Teng, W., Shan, Z., Wang, S., Li, J., Zhu, L., Zhou, J., Mao, J., Yu, X., Li, J., Chen, Y., Xue, H., Fan, C., Wang, H., Zhang, H., Li, C., Zhou, W., Gao, B., Shang, T., Zhou, J., Ding, B., Ma, Y., Wu, Y., Xu, H., Liu, W., 2011. The prevalence of thyroid disorders during

- early pregnancy in China: the benefits of universal screening in the first trimester of pregnancy. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 164, 263–268. doi:10.1530/EJE-10-0660
- Wang, Y., Dong, J., Wang, Y., Wei, W., Song, B., Shan, Z., Teng, W., Chen, J., 2016. Developmental Hypothyroxinemia and Hypothyroidism Reduce Parallel Fiber-Purkinje Cell Synapses in Rat Offspring by Downregulation of Neurexin1/Cb1n1/GluD2 Tripartite Complex. *Biol. Trace Elem. Res.* doi:10.1007/s12011-016-0664-9
- Wang, Z.-Q., Porreca, F., Cuzzocrea, S., Galen, K., Lightfoot, R., Masini, E., Muscoli, C., Mollace, V., Ndengle, M., Ischiropoulos, H., Salvemini, D., 2004. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 869–878. doi:10.1124/jpet.103.064154
- Warner, M.J., Ozanne, S.E., 2010. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem. J.* 427, 333–347. doi:10.1042/BJ20091861
- Wasco, E.C., Martinez, E., Grant, K.S., St Germain, E.A., St Germain, D.L., Galton, V.A., 2003. Determinants of iodothyronine deiodinase activities in rodent uterus. *Endocrinology* 144, 4253–4261. doi:10.1210/en.2003-0490
- Wasniewska, M., De Luca, F., Cassio, A., Oggiano, N., Gianino, P., Delvecchio, M., Aiazzi, R., Stoppioni, V., Lombardo, F., Messina, M.F., Valenzise, M., Arrigo, T., 2003. In congenital hypothyroidism bone maturation at birth may be a predictive factor of psychomotor development during the first Year of life irrespective of other variables related to treatment. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 149, 1–6.
- Wei, F., Dubner, R., Ren, K., 1999. Nucleus reticularis gigantocellularis and nucleus raphe magnus in the brain stem exert opposite effects on behavioral hyperalgesia and spinal Fos protein expression after peripheral inflammation. *Pain* 80, 127–141.
- Weiss, R.E., Refetoff, S., 1996. Effect of thyroid hormone on growth. Lessons from the syndrome of resistance to thyroid hormone. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 25, 719–730.
- Wesierska, M.J., Duda, W., Dockery, C.A., 2013. Low-dose memantine-induced working memory improvement in the allothetic place avoidance alternation task (APAAT) in young adult male rats. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 203. doi:10.3389/fnbeh.2013.00203
- Williams, G.R., 2000. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8329–8342.
- Willnow, T.E., Nykjaer, A., Herz, J., 1999. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat. Cell Biol.* 1, E157-162. doi:10.1038/14109
- Wirth, E.K., Roth, S., Blechschmidt, C., Hölter, S.M., Becker, L., Racz, I., Zimmer, A., Klopstock, T., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Wurst, W., Naumann, T., Bräuer, A., de Angelis, M.H., Köhrle, J., Grüters, A., Schweizer, U., 2009. Neuronal 3',3,5-triiodothyronine (T3) uptake and behavioral phenotype of mice deficient in Mct8, the neuronal T3 transporter mutated in Allan-Herndon-Dudley syndrome. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 9439–9449. doi:10.1523/JNEUROSCI.6055-08.2009
- Wirth, E.K., Schweizer, U., Köhrle, J., 2014. Transport of thyroid hormone in brain. *Front. Endocrinol.* 5, 98. doi:10.3389/fendo.2014.00098
- Wood, P.B., 2008. Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert Rev. Neurother.* 8, 781–797. doi:10.1586/14737175.8.5.781
- Woods, R.J., Sinha, A.K., Ekins, R.P., 1984. Uptake and metabolism of thyroid hormones by the rat foetus in early pregnancy. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 67, 359–363.
- Woolf, C.J., Ma, Q., 2007. Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. *Neuron* 55, 353–364. doi:10.1016/j.neuron.2007.07.016
- Wrutniak-Cabello, C., Casas, F., Cabello, G., 2001. Thyroid hormone action in mitochondria. *J. Mol. Endocrinol.* 26, 67–77.

- Xie, J., Ho Lee, Y., Wang, C., Mo Chung, J., Chung, K., 2001. Differential expression of alpha1-adrenoceptor subtype mRNAs in the dorsal root ganglion after spinal nerve ligation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 93, 164–172.
- Yaksh, T.L., Rudy, T.A., 1978. Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques. *Pain* 4, 299–359.
- Yang, H., Shao, M., Chen, L., Chen, Q., Yu, L., Cai, L., Lin, Z., Zhang, C., Lu, X., 2014. Screening strategies for thyroid disorders in the first and second trimester of pregnancy in China. *PLoS One* 9, e99611. doi:10.1371/journal.pone.0099611
- Yang, W., Rachez, C., Freedman, L.P., 2000. Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8008–8017.
- Yi, J., Zheng, J., Zhang, W., Wang, S., Yang, Z., Dou, K., 2014. Decreased pain threshold and enhanced synaptic transmission in the anterior cingulate cortex of experimental hypothyroidism mice. *Mol. Pain* 10, 38. doi:10.1186/1744-8069-10-38
- Zanoveli, J.M., Nogueira, R.L., Zangrossi, H., 2007. Enhanced reactivity of 5-HT1A receptors in the rat dorsal periaqueductal gray matter after chronic treatment with fluoxetine and sertraline: evidence from the elevated T-maze. *Neuropharmacology* 52, 1188–1195. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.01.001
- Zhang, G.-W., Yang, C.-X., Zhang, D., Gao, H.-E., Zhang, Y., Jiao, R.-S., Zhang, H., Liang, Y., Xu, M.-Y., 2010. Noradrenergic mechanism involved in the nociceptive modulation of nociceptive-related neurons in the caudate putamen. *Neurosci. Lett.* 480, 59–63. doi:10.1016/j.neulet.2010.06.003
- Zhang, M., Wang, K., Ma, M., Tian, S., Wei, N., Wang, G., 2016. Low-Dose Cannabinoid Type 2 Receptor Agonist Attenuates Tolerance to Repeated Morphine Administration via Regulating μ -Opioid Receptor Expression in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. *Anesth. Analg.* 122, 1031–1037. doi:10.1213/ANE.0000000000001129
- Zhang, Q., Bai, Z., Gong, Y., Liu, X., Dai, X., Wang, S., Liu, F., 2015. Monitoring glutamate levels in the posterior cingulate cortex of thyroid dysfunction patients with TE-averaged PRESS at 3T. *Magn. Reson. Imaging* 33, 774–778. doi:10.1016/j.mri.2015.03.004
- Zhang, X.K., Kahl, M., 1993. Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 4, 156–162.
- Zhao, W.-C., Zhang, B., Liao, M.-J., Zhang, W.-X., He, W.-Y., Wang, H.-B., Yang, C.-X., 2014. Curcumin ameliorated diabetic neuropathy partially by inhibition of NADPH oxidase mediating oxidative stress in the spinal cord. *Neurosci. Lett.* 560, 81–85. doi:10.1016/j.neulet.2013.12.019
- Zheng, G., Marino, M., Zhao, J., McCluskey, R.T., 1998. Megalin (gp330): a putative endocytic receptor for thyroglobulin (Tg). *Endocrinology* 139, 1462–1465. doi:10.1210/endo.139.3.5978
- Zhuo, M., Gebhart, G.F., 1997. Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. *J. Neurophysiol.* 78, 746–758.
- Zhuo, M., Gebhart, G.F., 1990. Characterization of descending inhibition and facilitation from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *Pain* 42, 337–350.
- Zifa, E., Fillion, G., 1992. 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 44, 401–458.
- Zimmermann, K., Hein, A., Hager, U., Kaczmarek, J.S., Turnquist, B.P., Clapham, D.E., Reeh, P.W., 2009. Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse. *Nat. Protoc.* 4, 174–196. doi:10.1038/nprot.2008.223
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

- Zucchi, R., Accorroni, A., Chiellini, G., 2014. Update on 3-iodothyronamine and its neurological and metabolic actions. *Front. Physiol.* 5, 402. doi:10.3389/fphys.2014.00402
- Zucchi, R., Chiellini, G., Scanlan, T.S., Grandy, D.K., 2006. Trace amine-associated receptors and their ligands. *Br. J. Pharmacol.* 149, 967–978. doi:10.1038/sj.bjp.0706948

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado **“ESTUDO DAS REPERCUSSÕES DO HIPOTIREOIDISMO GESTACIONAL EXPERIMENTAL NA CIRCUITARIA NEURAL DE CONTROLE DA DOR NA PROLE DE RATOS.”** sob coordenação do Prof.^o. Dr.^o. **DANIEL BADAUE PASSOS JR.** (protocolo **CEPA 71/2012**) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 14/12/2012.

São Cristóvão, 21 de janeiro de 2013.

Prof.^a. Dr.^a. **FLÁVIA TEIXEIRA SILVA**
Presidente do CEPA/UFS

Cidade Universitária “Prof. Aloísio de Campos”
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606

ORIGINAL ARTICLE

Experimental hypothyroidism during pregnancy affects nociception and locomotor performance of offspring in rats

I.G.N. Alves¹, K.M.L. da Cruz², C.M.D. Mota³, D.S. de Santana¹, D.P. Gaujac¹, V.C.B. de Carvalho¹, L.C. Reis³, K.A. Sluka⁴, L.J. Quintans-Junior¹, A.R. Antonioli³, J.M. DeSantana², D. Badauê-Passos Jr¹, V.J. de Santana-Filho²

¹ Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Brazil

² Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Brazil

³ Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Department of Physical Therapy and Rehabilitation Science, University of Iowa, USA

Correspondence

Daniel Badauê-Passos Jr
E-mail: badauelj@ufse.br

Funding sources

None.

Conflicts of interest

None declared.

Accepted for publication

27 February 2013

doi:10.1002/ejp.1532-2149.2013.00306.x

Abstract

Background: Thyroid hormones (THs) play a crucial role in the development of several organic systems. An adequate support of maternal THs may be required to ensure a normal nociceptive function of offspring into adulthood. We investigated the impact of experimental gestational hypothyroidism (EGH) on nociceptive threshold and motor performance in the offspring at different post-natal days (PND) in both male and female rats.

Methods: EGH was induced by the administration of 0.02% methimazole (MMI) in the drinking water from the ninth day of gestation until birth. The offspring from MMI-treated dams (OMTDs) or from water-treated dams (OWTDs) were assessed for thermal and mechanical nociception using the tail-flick test and von Frey filaments, respectively. Both rota-rod and grip strength were used to assess motor function.

Results: OMTD had reduced thermal ($p < 0.05$) but not mechanical threshold at all studied ages (60 and 120 PND). Sixty-day-old OMTD presented reduced latency to the tail-flick test ($p = 0.01$). Grip strength in 120-day-old OMTD was reduced ($p < 0.01$). However, only male OMTD presented a lower locomotor performance on the rota-rod test when analysed on the 60th PND ($p < 0.01$).

Conclusions: EGH promotes hypersensitivity to noxious thermal but not mechanical stimulus. Moreover, motor force is similarly reduced in male and female OMTDs, whereas motor performance is reduced only in mature male OMTD, suggesting the presence of a protective factor in females.

1. Introduction

Thyroid hormones (THs) are essential to normal body development, especially to structural and functional formation of the central nervous system (CNS) (Joffe and Sokolov, 1994; Calzà et al., 1997; Bauer and Whybrow, 2001; Koibuchi et al., 2001; Bernal, 2005; Koromilas et al., 2010). The lack of THs during a critical period of development has been associated with

irreversible neurological disorders (Smith et al., 2002). A high prevalence of hypothyroidism has been reported in pregnant women (Glinoez, 1998; Nambiar et al., 2011; Stagnaro-Green et al., 2011).

The role of THs in mammalian brain development has been extensively studied (Porterfield and Hendrich, 1993). However, it is not clear how thyroid dysfunction during intrauterine life can affect these organisms later in life. It is known that THs act on